

**Das PR-Protein CBP20 - Untersuchungen zur Induktion der
Synthese und Akkumulation sowie zum innerzellulären
Transport unter Verwendung von *in vitro* Kulturen des Tabak
und der Hefe**

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von: Dipl.-Ing. Götz Hensel
aus: Buttstädt

1. Referentin: PD Dr. I. Kunze
2. Referent: Prof. Dr. R.-R. Mendel
eingereicht am: 10.01.2000
mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.04.2000

2000
(Druckjahr)

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 1996 bis Dezember 1999 in der Arbeitsgruppe Hefegenetik am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben angefertigt. Diese Arbeit wurde von Oktober 1996 bis September 1999 im Rahmen des Projektes mit dem Thema: „Identifizierung und Charakterisierung eines neuen Proteintransportweges bei Pflanzen und Hefen“ (Förderkennzeichen 859A/8284) durch das Kultusministerium des Landes Sachsen-Anhalt gefördert sowie von Oktober 1999 bis Dezember 1999 aus Haushaltsmitteln finanziert.

In erster Linie danke ich meiner Mentorin und Projektleiterin Frau PD Dr. habil. I. Kunze. Sie war nicht nur eine ausgezeichnete fachliche und diskussionsbereite Betreuerin, die mir immer mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite stand, sondern leistete auch umfangreiche Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Dem Leiter der Arbeitsgruppe Hefegenetik Herrn Prof. Dr. G. Kunze danke ich für die Überlassung des Themas sowie die sehr intensive wissenschaftliche Betreuung und Unterstützung.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. R.-R. Mendel (TU Braunschweig, Deutschland), da er mir die Möglichkeit gegeben hat, an der TU Braunschweig meine Arbeit einzureichen.

Ebenso bin ich Herrn Prof. Dr. K. Müntz und Prof. Dr. U. Sonnewald für die wertvollen Hinweise und kritischen Ratschläge zu Dank verpflichtet.

Innerhalb der Arbeitsgruppe bedanke ich mich bei Frau H. Bohlmann, Frau G. Oswald, Frau R. Franz und Frau K. Schäfer für die Hilfe bei den experimentellen Arbeiten. Weiterhin waren die zahlreichen fachlichen Diskussionen mit Frau Dr. R. Stoltenburg, Herrn Dr. H. Rösel, Herrn Dr. M. Lehmann, Herrn Dr. T. Wartmann und Frau K. Tag stets wertvoll für meine Arbeiten.

Am IPK möchte ich mich bei Frau Dr. R. Manteuffel für die Herstellung der Antiseren, bei Herrn Dr. C. Horstmann für die N-terminale Aminosäuresequenzanalyse und bei Frau S. König für die Nukleinsäuresequenzierung bedanken. Mein weiterer Dank gilt auch den Graphikern Frau A. Kilian und Frau U. Thiemann sowie den Fotografen Frau B. Schäfer und Frau H. Ernst für die schnelle und gute Ausführung von Bildbeschriftungen und fotografischen Arbeiten.

Danken möchte ich auch allen Mitarbeitern des Institutes, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben und an dieser Stelle nicht namentlich erwähnt sind.

Es gab auch einige Materialien, die mir dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt wurden:

Das Gen *SGFP-TYG* stammt von Frau Prof. J. Sheen (Dept. of Mol. Biol., Boston, MA, USA), der Stamm CI3ABYS86 war von Herrn Prof. D. Wolf (Universität Stuttgart, Deutschland) und die Antikörper Anti-Rubisco und Anti-TK stammen von Dr. K.-H. Süß und Prof. U. Sonnewald (IPK, Gatersleben, Deutschland).

Zu ganz besonderem Dank bin ich meiner Frau, Anke Hensel, verpflichtet, die mich immer unterstützt und motiviert hat und somit auch zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Abschließend, aber nicht weniger herzlich, möchte ich mich bei meiner Mutter und meinen Schwiegereltern bedanken.

Abkürzungsverzeichnis

AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
A. dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AK	Antikörper
Anti-CHN	Antikörper gegen die Chitinase der Klasse I
Anti-CBP20	Antikörper gegen CBP20
Anti-GLN	Antikörper gegen die β -1,3-Glucanase
Anti-Rubisco	Antikörper gegen die große Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase
Anti-TK	Antikörper gegen die Transketolase
ATP	Adenosintriphosphat
6-BAP	6-Benzylaminopurin
CHN	Chitinase der Klasse I
CLSM	Confocale Laser Scanning Microscopie
d	Tag(e)
2,4D	2,4-Dichlorphenoxyessigsäure
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Dinatrium-Salz)
ER	Endoplasmatisches Reticulum
et al.	et aliter (und andere)
g	Erdbeschleunigung
GA	Golgi Apparat
GFP	„green fluorescent protein“
GLN	β -1,3-Glucanase
GUS	β -Glucuronidase
h	Stunde(n)
IAA	Indol-3-acetic acid
INA	2,6-dichloroisonicotinic acid
JA	Jasmonsäure
kbp	Kilobasenpaare
kDa	Kilo-Dalton
KIN	Kinetin
LB	Luria broth
LS	Linsmaier Skoog
MDH	Malatdehydrogenase
MES	4-Morpholino-ethansulfonsäure
min	Minute(n)
Mm	Molekularmasse
MOPS	3-(N-morpholino)-propansulfonsäure
m-RNA	„messenger“ RNA
MS	Murashige und Skoog
NAA	α -Naphthylacetic acid
NC-Membran	Nitrocellulosemembran
NSP	N-terminales Signalpeptid
OD	optische Dichte
OLP	„osmotin like protein“
PAA	Polyacrylamid
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
pDNA	Plasmid-DNA
PEG	Polyethylenglykol

PR	„pathogenesis-related“
PVDF-Membran	Polyvinylidendifluoridmembran
RNA	Ribonukleinsäure
SA	„salicylic acid“
SAR	„systemic acquired resistance“
SDS	„sodium-dodecylsulphat“
SDS-PAGE	„sodium-dodecylsulphat“-Polyacrylamidgelelektrophorese
sec.	Sekunde(n)
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TE	Tris/EDTA
TK	Transketolase
TMV	Tabak-Mosaik-Virus
TNT	Tris/NaCl/Triton X 100 (Komponenten eines Puffers)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheiten)
U/min	Umdrehungen/Minute
UV	Ultraviolettes Licht
ÜNK	Übernachtkultur
Vol.	Volumen
VTP	vakuoläres Targetpeptid
z.B.	zum Beispiel
ZW	Zellwand

Gattungsnamen

<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 Einleitung.....	1
1.1 Die PR-Proteine der Pflanze.....	1
1.2 Die Proteinsekretion.....	5
1.3 Das wundinduzierbare Tabak PR-4 Protein CBP20.....	6
1.4 Die Hefe als Modell für die heterologe Genexpression.....	6
1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit.....	7
2 Material und Methoden.....	8
2.1 Bakterien- und Hefestämme, Phagen und Plasmide, Pflanzen-Kulturen	8
2.2 Oligonukleotide	9
2.3 Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen.....	10
2.3.1 Medien für die Bakterienstämme.....	10
2.3.2 Medien für die Hefestämme.....	11
2.3.3 Medien für die Pflanzenkulturen.....	12
2.3.4 Kultivierungsbedingungen und Lagerung.....	12
2.4 DNA-Isolation.....	13
2.4.1 Plasmid-DNA aus Bakterien.....	13
2.4.1.1 „Maxi-Isolation“.....	13
2.4.1.2 „Mini-Isolation“.....	13
2.4.2 Isolation von Phagen-DNA.....	14
2.4.3 Isolation von genomischer DNA aus Blättern von Tabakpflanzen SNN.....	15
2.5 Restriktion von DNA.....	15
2.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten	15
2.7 Isolation von DNA-Fragmenten.....	15
2.8 Ligation von DNA.....	16
2.9 Sequenzierung der Nukleotidsequenzen.....	16
2.10 Southern-Hybridisierung.....	16
2.10.1 Transfer von gelelektrophoretisch getrennten DNA-Fragmenten auf Trägermaterial.....	16
2.10.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit α -[³² P]dATP.....	16
2.10.3 DNA-Hybridisierung.....	17

	Seite
2.11 RNA-Isolation.....	17
2.11.1 RNA-Isolation aus Tabaksuspensionen.....	17
2.11.2 RNA-Isolation aus Blättern von <i>in vitro</i> -Pflanzen des Tabak.....	17
2.12 Formaldehyd-Agarose Gelelektrophorese zur Trennung von RNA.....	18
2.13 Northern-Hybridisierung.....	18
2.14 Protein-Extraktion.....	19
2.14.1 Extraktion von Gesamt-Protein mit TNT-Puffer.....	19
2.14.2 Isolation von zellwandständigen Proteinen.....	19
2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	19
2.16 Westernblotexperimente.....	21
2.16.1 Transfer von gelelektrophoretisch getrennten Polypeptiden auf Trägermaterial.....	21
2.16.2 Antikörperbehandlung.....	21
2.16.3 Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran.....	21
2.16.4 Sequenzierung des N-Terminus von Polypeptiden.....	22
2.17 „Pulse-Chase“-Experimente.....	22
2.18 Transformationen.....	23
2.18.1 Transformation von <i>E. coli</i>	23
2.18.2 Transformation von <i>A. tumefaciens</i>	23
2.18.3 Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	24
2.18.4 Agrobakterien-vermittelte Transformation von <i>N. tabacum</i> SNN.....	24
2.19 Untersuchungen zur Akkumulation von CBP20 in Tabaksuspensionskulturen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.....	25
2.20 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....	25
2.20.1 α -Mannosidase (E.C. 3.2.1.24).....	25
2.20.2 Malatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.37).....	25
2.20.3 β -Glukuronidase (E.C. 3.2.1.31).....	26
2.21 Screening von Phagenbanken.....	26
2.22 Subklonierung von CBP20 und Expression in <i>E. coli</i>.....	26
2.23 Promotorisolation, Klonierung der Genfusion Promotor+GUS und Transformation in den Agrobakterienstamm EHA105pEHA105.....	27
2.24 Klonierung von „sense“- und „antisense“-Konstrukten von CBP20 und Transformation in den Agrobakterienstamm EHA105pEHA105.....	27
2.25 Klonierung der Genfusion CBP20-GFP und Transformation in den Hefestamm CI3ABYS86.....	27
2.26 Transformation von GFP in den Hefestamm CI3ABYS86.....	28

	Seite
2.27	Fusion des <i>GFP</i>-Gens mit <i>NSP</i>- und <i>VTP</i>-Sequenzen des <i>CHN</i>-Gens der Klasse I und Transformation in den Hefestamm CI3ABYS86.....
	28
2.28	Confocale Laser Scanning Microscopie (CLSM).....
	29
2.28.1	Verwendete Geräte und Einstellungen.....
	29
2.28.2	Kultivierung der Hefezellen für das CLSM und spezifische Färbung verschiedener Hefeorganellen.....
	30
2.29	Charakterisierung isolierter Zellwände suspensionkultivierter Zellen.....
	30
2.29.1	Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes.....
	30
2.29.2	Bestimmung des Zellulosegehaltes.....
	30
2.29.3	Bestimmung von Uronsäuren.....
	31
2.29.4	Bestimmung des DNA-Gehaltes.....
	31
2.29.5	Bestimmung der Porengröße von Zellwänden.....
	32
3	Ergebnisse.....
	33
3.1	Untersuchungen im pflanzlichen System.....
	33
3.1.1	Datenbank-Screening und Klonierung von <i>CBP20</i>
	33
3.1.1.1	Isolation der <i>CBP20</i> codierenden cDNA.....
	33
3.1.1.2	Vervollständigung des <i>CBP20</i> -codierenden cDNA-Fragmentes.....
	33
3.1.1.3	Isolation des <i>CBP20</i> -Gens.....
	34
3.1.2	Lokalisierung des Proteins CBP20 in <i>in vitro</i> -Pflanzen, Gewächshauspflanzen und Suspensionskulturen des Tabak.....
	36
3.1.2.1	Nachweis von CBP20 in Blatt, Sproß und Wurzel von <i>in vitro</i> -Pflanzen und Zellen von Suspensionskulturen.....
	36
3.1.2.2	Einfluß des Blattalters auf die CBP20 Akkumulation.....
	36
3.1.3	Induzierbarkeit der Synthese von CBP20.....
	38
3.1.3.1	Einfluß der Verwundung auf die Akkumulation von CBP20.....
	39
3.1.3.2	Einfluß von Salicylsäure auf die Akkumulation von CBP20.....
	40
3.1.3.3	Induzierbarkeit der Synthese von CBP20 durch Schwermetalle.....
	40
3.1.3.3.1	Einfluß von Schwermetallen auf die Protein- und Transkriptkonzentration von CBP20 in Tabaksuspensionskulturen.....
	41
3.1.3.3.2	Einfluß von Schwermetallen auf die Protein- und Transkriptkonzentration von CBP20 in Blättern von <i>in vitro</i> -Pflanzen.....
	42
3.1.3.3.3	Einfluß von Zinkchlorid auf die Protein- und Transkriptkonzentration von CBP20 in Blättern von <i>in vitro</i> - und Gewächshauspflanzen.....
	44
3.1.3.3.4	Einfluß von Zinkchlorid auf die Halbwertszeit der CBP20-Transkriptkonzentration.....
	46
3.1.4	Untersuchungen zur Regulation des <i>CBP20</i> -Gens.....
	47
3.1.4.1	Isolation des Promotors von <i>CBP20</i>
	47
3.1.4.2	Untersuchungen zur Aktivität der Promotorsequenzen.....
	49
3.1.4.3	Untersuchungen zum Einfluß von „sense“- und „antisense“-Konstrukten von <i>CBP20</i> in transgenen Tabakpflanzen.....
	50
3.1.5	Nachweis von CBP20 in Zellen und Medium von Tabaksuspensionskulturen.....
	52

	Seite
3.1.5.1	Akkumulation des CBP20-Proteins im Medium in Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium..... 52
3.1.5.2	Untersuchungen zum Einfluß von 2,4D auf die Transkriptkonzentration von CBP20 in suspensionskultivierten Tabakzellen..... 54
3.1.5.3	Untersuchungen zur Reifung von CBP20..... 56
3.1.5.4	Nachweis von CBP20 in der Zellwand..... 57
3.1.5.5	Bestimmung der Porosität der Zellwände..... 59
3.1.5.6	Charakterisierung der Zellwände bezüglich ihres Gehaltes an Kohlenhydraten, Zellulose, Galakturonsäure und Proteinen..... 61
3.1.5.7	Untersuchungen zur Art der Bindung von CBP20 an die Zellwand..... 65
3.2	Untersuchungen in der Hefe..... 67
3.2.1	Expression des Pflanzengens <i>CBP20</i> in <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 67
3.2.1.1	Klonierung von <i>GFP</i> und der Genfusionen <i>CBP20-GFP</i> und <i>N-GFP-V</i> und Transformation in den <i>Saccaromyces cerevisiae</i> -Stamm Cl3ABYS86..... 67
3.2.1.2	Akkumulation von <i>GFP</i> und der Fusionsproteine in Zellextrakten und Kulturmedien während der Kultivierung..... 69
3.2.2	Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Hilfe der Confocalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)..... 70
4	Diskussion..... 72
4.1	Die Induzierbarkeit der CBP20 Akkumulation ähnelt der anderer PR-Proteine der Klasse I codierender Gene..... 72
4.2	Die Synthese des Proteins CBP20 wird durch Schwermetalle beeinflusst..... 74
4.3	Durch die Gen- und Promotoranalyse können Aussagen über die Synthese und Regulation des Gens <i>CBP20</i> gemacht werden..... 77
4.4	CBP20 wird von Tabaksuspensionskulturen exportiert..... 80
4.5	Der innerzelluläre Transport von CBP20 in die Vakuole der Hefe erfolgt zeitlich verzögert..... 84
5	Zusammenfassung..... 88
6	Literatur..... 92

1 Einleitung

Pflanzen sind im Laufe ihres Lebens einer Vielzahl von streßauslösenden Umweltfaktoren wie Hitze, Trockenheit, Luftverschmutzung, erhöhter bzw. wechselnder Salzgehalt des Bodens, unterschiedliche Nährstoffquellen und Pathogenbefall ausgesetzt. Innerhalb eines gewissen Toleranzbereiches kann sich die Pflanze an veränderte Umweltbedingungen anpassen. Dieser Prozeß der Anpassung bzw. Streßbeantwortung ist sehr komplex und umfaßt die Veränderung des Genexpressionsmusters bzw. die Induktion der Synthese verschiedener Abwehrproteine. Dazu gehören 1) Strukturproteine, die in der extrazellulären Matrix lokalisiert und an der Pathogenabwehr beteiligt sind, 2) Enzyme des Sekundärmetabolismus, z. B. solche für die Biosynthese von pflanzlichen Antibiotika und 3) die sogenannten „pathogenesis-related“- (PR) Proteine (Stintzi *et al.*, 1993).

1.1 Die PR-Proteine der Pflanze

„Pathogenesis-related“ Proteine sind pflanzliche Proteine, deren Synthese durch verschiedene Typen von Pathogenen wie Viren, Bakterien und Pilzen sowie durch Chemikalien, die den Effekt der Pathogeninfektion nachahmen oder gleiche Streßsituationen hervorrufen, induziert werden.

Schon in den frühen 60er Jahren konnte gezeigt werden, daß Tabakpflanzen nach Infektion mit dem Tabak Mosaik Virus (TMV) zu einer hypersensitiven Reaktion neigen, die zur Entwicklung sowohl einer lokalen als auch einer systemischen Resistenz der Pflanze führt. Knapp 10 Jahre später wurde beobachtet, daß die Entwicklung dieser Resistenz mit der Induktion einiger Pflanzengene einhergeht, die im folgenden „Pathogenesis-related“ Proteine genannt wurden (Review: Bol *et al.*, 1996). Später konnte dann auch gezeigt werden, daß einige PR-Proteine nach Behandlung mit Chemikalien, durch Luftverunreinigungen, Wachstumshormone wie z.B. Auxine und Zytokinine, Ethylen, aber auch durch osmotischen Streß bzw. bei Salzstreß induziert werden (Review: Stintzi *et al.*, 1993; Yun *et al.*, 1997; Kitajima and Sato, 1999).

PR-Proteine werden aufgrund ihrer immunologischen Verwandtschaft und Sequenzübereinstimmung in verschiedene Gruppen eingeteilt. Eine Übersicht ist in der folgenden Tabelle gegeben (Tab. 1-1).

Tab. 1-1: Einteilung der PR-Proteine nach Bol *et al.* (1996), verändert

PR-Gruppe	Extrazelluläre saure PR-Proteine		Vakuoläre basische PR-Proteine		Funktion
	Bezeichnung	Mm [kDa]	Bezeichnung	Mm [kDa]	
1	1a, 1b, 1c	16	1d	16	„antifungal“
2	2a, 2b, 2c β -1,3-Glukanase II	40	2e β -1,3-Glukanase I	33	„antifungal“
	2d β -1,3-Glukanase III	36			
3	3a, 3b Chitinase II	28	3d, 3e Chitinase I	33	„antifungal“
	3f Chitinase IIIa	29	3g Chitinase IIIa	30	
	-	29	3h Chitinase V	39	
4	4a, 4b	14	4c, 4d CBP20	20	„antifungal“?
5	5a, 5b	24	5c, 5d Osmotin	24	„antifungal“?
6	Proteinase Inhibitoren II		Proteinase Inhibitoren I		Inhibitor

PR-Proteine werden aufgrund ihres Lokalisationsortes in extrazelluläre, die einen sauren isoelektrischen Punkt besitzen und vakuoläre PR-Proteine, die einen basischen isoelektrischen Punkt haben, eingeteilt (Bol *et al.*, 1996).

In der 1. Gruppe sind die zuerst entdeckten, 15-17 kDa großen, PR-Proteine zusammengefaßt, deren biologische Funktion bis jetzt noch nicht ganz geklärt werden konnte. Einige Mitglieder dieser Gruppe weisen eine Aktivität gegen Pilzbefall auf Niderman *et al.*, 1995; Cordier *et al.*, 1998; Rauscher *et al.*, 1999). Niderman und Mitarbeiter (1995) zeigten, daß PR-1 Proteine die Sporenkeimung und das Hyphenwachstum von *Phytophthora infestans* inhibieren. Cordier und Mitarbeiter (1998) konnten ein PR-1 Protein der Tomate in der pilzlichen Zellwand des infizierenden Pilzes *Phytophthora parasitica* nachweisen.

Rauscher und Mitarbeiter (1999) konnten ebenfalls zeigen, daß ein PR-1 Protein die Pilzzellwand verändert und die Differenzierung des Pilzes vermindert.

Die 2. Gruppe der PR-Proteine enthält 3 strukturell verschiedene Klassen von β -1,3-Glukanasen mit unterschiedlichen glukanolysischen Aktivitäten (Meins *et al.*, 1992; Payne *et al.*, 1990; Linthorst *et al.*, 1990a; Ward *et al.*, 1991a; Kauffmann *et al.*, 1987).

Zur Gruppe 3 der PR-Proteine gehören verschiedene Chitinase-Isoenzyme mit unterschiedlichen Chitinase- und Lysozymaktivitäten (Collinge *et al.*, 1993; Linthorst *et al.*, 1990b; Legrand *et al.*, 1987). Einige von Ihnen zeigen entweder allein oder im Zusammenspiel mit β -1,3-Glukanasen Aktivität gegen Pilzbefall, indem sie die Chitine und 1,3- β -Glukane als Bestandteile der Pilzzellwand hydrolysieren (Mauch *et al.*, 1988; Review: Boller, 1993).

Die PR-Proteine der Gruppe 4 sind bis jetzt wenig erforscht. Sie enthält mehrere PR-Proteine mit einer Molekularmasse zwischen 13 und 20 kDa, deren Aktivität bzw. Funktion noch unbekannt ist (Kauffmann *et al.*, 1990; Friedrich *et al.*, 1991; Linthorst *et al.*, 1991; Ponstein *et al.*, 1994).

Die Proteine der Gruppe 5 weisen alle Sequenzähnlichkeit zum süß schmekkenden Protein Thaumatin aus *Thaumatococcus daniellii* Benth. (van der Wel and Loeve, 1972) auf. Es konnte gezeigt werden, daß einige Mitglieder dieser Gruppe das Hyphenwachstum oder die Sporenbildung von verschiedenen Pilzen inhibieren (Højgaard *et al.*, 1991; Vigers *et al.*, 1991; Woloshuk *et al.*, 1991; Vigers *et al.*, 1992; Roberts and Selitrennikoff, 1990). Weitere Vertreter dieser Gruppe sind Osmotin und osmotinähnliche Proteine. Ihre Synthese wird durch Salz- und andere Streßsituationen induziert (King *et al.*, 1986; Neale *et al.*, 1990; Woloshuk *et al.*, 1991).

Die in Gruppe 6 zusammengefaßten Proteinaseinhibitoren unterbinden die proteolytische Aktivität der bakteriellen oder fungiziden Proteine in der Pflanze (Geoffroy *et al.*, 1990; Ryan, 1990).

Die Synthese der PR-Proteine wie die der β -1,3-Glukanasen (PR-2), Chitinasen (PR-3) und Osmotin bzw. das „Osmotin-like Protein“ (PR-5), wird nicht nur durch unterschiedliche Streßfaktoren induziert, sondern erfolgt auch in Abhängigkeit bestimmter Entwicklungsphasen oder/und erfolgt gewebespezifisch gebildet. So wurden die genannten Vertreter beispielsweise konstitutiv in Wurzeln (van de Rhee *et al.*, 1993; Shinshi *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1996) oder in seneszenten Blättern (Lotan *et al.* 1989; Hanfrey *et al.*, 1996) nachgewiesen. Für saure Chitinasen und PR-1 Proteine wurde eine erhöhte Expression während der Blüte (Neale *et al.*, 1990; Lotan *et al.*, 1989; Fraser, 1981) nachgewiesen.

Die Induktion der PR-Genexpression durch Pathogenbefall wird durch verschiedene Signalmoleküle vermittelt, die auf verschiedene Weise übertragen werden können (Abb. 1-1)

Die Signaltransduktion kann sowohl SA-abhängig als auch SA-unabhängig erfolgen. Die Interaktion zwischen den beiden Wegen verleiht der Pflanze ein großes regulatorisches Potential für die Aktivierung verschiedener Resistenzmechanismen in unterschiedlichen Kombinationen.

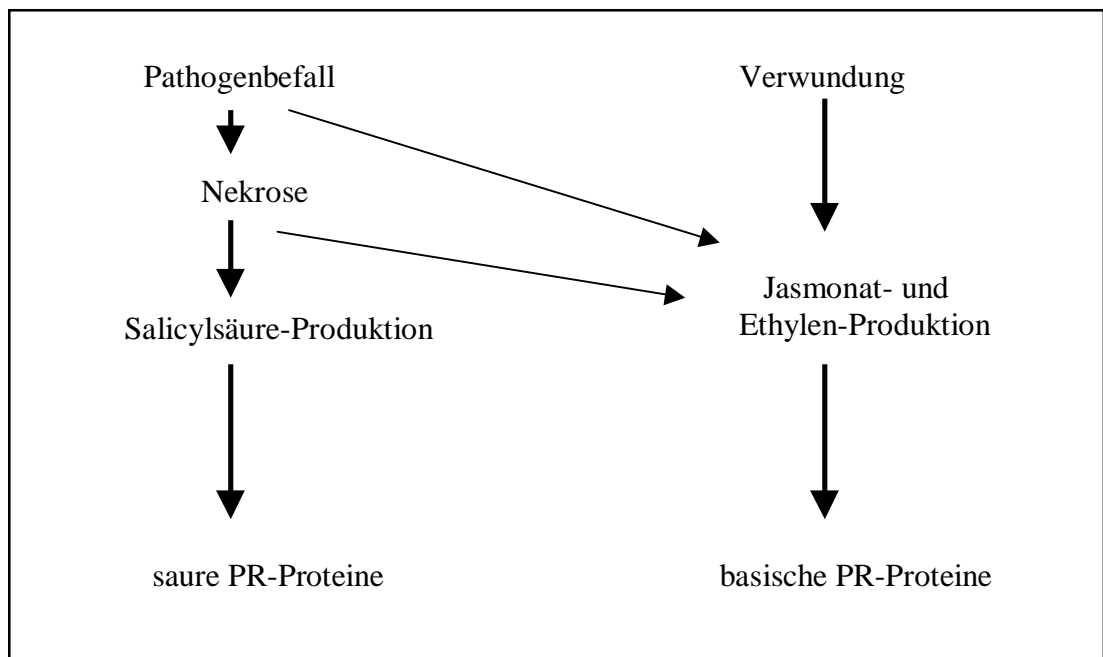


Abb. 1-1: Modell für die Induktion der Synthese von PR-Proteinen nach Pieterse and van Loon (1999), verändert.

Beim Pathogenbefall einer Pflanze werden an der Stelle der Infektion häufig nekrotische Läsionen gebildet, in deren Folge es zur verstärkten Bildung von SA (Malamy *et al.*, 1990; Metraux *et al.*, 1990) und zur Ausbildung der „Systemic Acquired Resistance“ (SAR) kommen kann. Im Ergebnis dessen wird in der Pflanze eine systemische Resistenz gegen ein breites Spektrum an Krankheitserregern ausgebildet (Ryals *et al.*, 1996). Dabei kommt es hauptsächlich zur Akkumulation von sauren PR-Proteinen. Der Einfluß der SA bei der Signaltransduktion wurde mittels transgener Pflanzen aufgezeigt. Diese sind aufgrund einer Deletion des *nahG*-Gens (codiert für die Salicylathydroxylase, welche SA durch Umwandlung in Catechol inaktiviert) nicht in der Lage, SA zu akkumulieren und bilden auch keine SAR aus (Gaffney *et al.*, 1993). Eine exogene Applikation von SA führt ebenso zur Induktion der SAR-Gene wie nach einem Pathogenbefall (Ward *et al.*, 1991).

Die basischen Vertreter der PR-Proteine werden hauptsächlich über einen SA-unabhängigen Signaltransduktionsweg induziert. Bei der Verwundung einer Pflanze wird die JA- und Ethylenproduktion erhöht. Die JA wird über den „Octadecanoid Pathway“ aus mehrfach ungesättigten C18 Fettsäuren gebildet (Review: Sembdner and Parthier, 1993). Hierbei wird ebenso wie bei SA nicht nur eine Resistenz in den verwundeten Zellen sondern auch eine systemische Resistenz ausgebildet (Schweizer *et al.*, 1998). Ebenso führt eine exogene Applikation von JA zu dem selben Expressionsmuster wie nach Verwundung. Niki *et al.* (1998) zeigte, daß saure PR-Gene (PR-1, 2 und 3) positiv durch SA und negativ durch JA beeinflusst werden. Demgegenüber werden die basischen Gene der Gruppen PR-2, 5 und 6 positiv durch JA und negativ durch SA reguliert.

Es gibt viele Berichte, daß die beiden Signalwege miteinander interagieren. So wurde z.B. der hemmende Effekt von SA auf die JA-regulierte Expression von Proteaseinhibitoren in verwundeten Tomatenpflanzen gezeigt (Doares *et al.*, 1995). Gleichzeitig reagieren Gene, die durch JA induziert werden, in transgenen *NahG*-Pflanzen, die im Vergleich zum WT weniger SA akkumulieren, hypersensitiv auf einen Pathogenbefall (Reymond and Farmer, 1998). Jedoch ist eine Inhibierung der JA-abhängigen Genexpression durch SA nicht immer der Fall. Die Zugabe von 2,6-dichloroisonicotinsäure (INA), ein SA-Analog, erhöht den JA-Spiegel und induziert JA-regulierte Gene im Reis (Schweizer *et al.*, 1997b).

Es gibt auch noch weitere Berichte für das Zusammenspiel der beiden Signalwege. Ethylen erhöht z. B. die Expression verschiedener Abwehrgene in Pflanzen. So wird die Expression des SA-induzierten PR-1-Genes durch Ethylen verstärkt (Lawton *et al.*, 1994). Weiterhin wird in Tabakpflanzen die Induktion der Synthese von den PR-Proteinen PR-1b und PR-5 entweder durch JA und Ethylen oder durch eine Kombination von JA und SA bewirkt (Xu *et al.*, 1994).

Durch diese Effekte ist die Pflanze in der Lage, unterschiedliche Abwehrgene bei Befall durch unterschiedliche Aggressoren zu aktivieren.

1.2 Die Proteinsekretion

PR-Proteine werden entweder in der Vakuole oder in der Zellwand der Pflanzenzellen akkumuliert. Den jeweiligen Bestimmungsort erreichen die Proteine über das Endomembransystem. Nach den allgemein geltenden Vorstellungen werden sie als Präproteine mit einem N-terminal lokalisierten, hydrophoben Signalpeptid synthetisiert.

Sie docken noch während ihrer Synthese im Polysomenverband an das endoplasmatische Reticulum (ER) an und werden cotranslational ins ER-Lumen eingeschleust (Staehelin, 1997; Gomord and Faye, 1996; Vitale and Denecke, 1999). Dort finden zahlreiche Modifikationen statt: Das Signalpeptid wird proteolytisch abgespalten, Hydroxylierungen und erste Glykosylierungsreaktionen können ablaufen und Disulfidbrücken können ausgebildet werden (Vitale *et al.*, 1993; Helenius *et al.*, 1992). Wenn die Faltung der Proteine abgeschlossen ist, erfolgt ihre „Verpackung“ in Vesikel, die zum Golgi Apparat (GA) weitertransportiert werden (Hawes *et al.*, 1995; Bassham and Raikhel, 1996; Sanderfoot and Raikhel, 1999). Die Kohlenhydratreste von Glykoproteinen werden dort häufig modifiziert (Driouch *et al.*, 1993). Vermutlich an der trans-Seite des GA findet die Sortierung der Proteine statt. Diejenigen Proteine, die ein vakuoläres Targetpeptid (VTP) besitzen, werden zur Vakuole transportiert, wohingegen solche ohne VTP dem Massenfluß folgend, die Zelloberfläche erreichen (Chrispeels, 1991; Chrispeels and Raikhel, 1992; Faye *et al.*, 1993; Satiat-Jeunemaitre and Hawes, 1993; Neuhaus, 1996; Neuhaus and Rogers, 1998; Herman and Larkins, 1999; Marty, 1999).

1.3 Das wundinduzierbare Tabak PR-4 Protein CBP20

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht ein PR-Protein der 4. Gruppe, dessen Identität zu Beginn der Untersuchungen noch unbekannt war. Wie sich im Verlaufe der Arbeit ergab, handelt es sich um das Chitin-bindende-Protein CBP20 mit einer Molekularmasse von ca. 20 kDa. Es wurde aus Blättern von *Nicotiana tabacum* Samsun NN nach Infektion mit dem Tabak-Mosaik-Virus erstmals von Ponstein *et al.* (1994) isoliert. CBP20 besitzt eine N-terminale Lektindomäne, die für die Bindung des Proteins an Chitin verantwortlich ist. CBP20 wird als Präproprotein mit einem N-terminalen Signalpeptid, welches die Aufnahme ins ER bewirkt und einer C-terminalen Erweiterung synthetisiert, die vermutlich für den Transport zur Vakuole verantwortlich ist. Die Prozessierung zum reifen Protein wird durch die Abspaltung des N-terminalen Signalpeptides und des C-terminalen Propeptides bewirkt. Ponstein *et al.* (1994) zeigten anhand von Northernblotexperimenten, daß die Synthese von CBP20 durch Verwundung, TMV-Befall und Behandlung mit Ethephon oder UV-Licht induziert werden kann.

1.4 Die Hefe als Modell für die heterologe Genexpression

Die Komplexität der Pflanze erschwert oft die Funktionsanalyse einzelner Proteine. Deshalb werden häufig Modellorganismen niederer Entwicklungsstufen verwendet, in

denen die Proteine exprimiert und ihr Transport analysiert werden kann. Bakterienzellen, wie z.B. *E. coli* sind leider nicht als Modelle für die Untersuchung pflanzlicher Transportmechanismen geeignet, denn prokaryontische post-translationale Modifikationen unterscheiden sich erheblich von eukaryontischen. Die Hefe *S. cerevisiae* ist dagegen als niederer Eukaryot in der Lage, heterologe Proteine korrekt zu falten (Gething and Sambrook, 1992; Sakaguchi, 1997), zu modifizieren (Hiraiwa *et al.*, 1997) und zu ihrem Bestimmungsziel zu transportieren (Tague and Chrispeels, 1987; Matsuoka and Nakamura, 1992; Nishimura *et al.*, 1995; Gal and Raikhel, 1994). Weiterhin gestattet ihre kurze Generationszeit eine zeitsparende Analyse der heterologen Genexpression. Außerdem gibt es bei der Hefe inzwischen eine Vielzahl von Mutanten, was eine Funktionsanalyse vieler Proteine ermöglicht (Review: Romanos *et al.*, 1992).

Der in dieser Arbeit verwendete Mutantenstamm *S. cerevisiae* CI3ABYS86 ist deficient für die vakuolären Proteasen A, B und CPY auf (Bröker *et al.*, 1991), was auf eine erhöhte Akkumulation der zu exprimierenden Gene hoffen läßt.

1.5 Ziel der vorliegenden Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten folgende Fragestellungen geklärt werden:

1. Welches Gen codiert für das ins Kulturmedium von Tabaksuspensionskulturen sekretierte 20 kDa Tabak-Protein?
2. In welchen Pflanzenorganen des Tabaks wird das Protein CBP20 lokalisiert?
3. Unter welchen Bedingungen kann die Synthese und die Akkumulation des Proteins induziert werden?
4. Wie ist die Expression des Proteins reguliert?
5. Bewirken „sense“- und „antisense“-Pflanzen eine Veränderung des Phänotyps bzw. der Genexpression und führen sie zu einer größeren Resistenz bzw. Sensibilität gegenüber induzierenden Bedingungen?
6. Wo ist das Protein in Tabaksuspensionskulturen lokalisiert und wie erfolgt der Transport zu seinem Bestimmungsort?
7. Kann durch Fusion des Proteins CBP20 mit dem Vitalmarker GFP die innerzelluläre Lokalisation und der Transport von CBP20 in der Hefe als heterologem Expressionssystem untersucht werden und wird CBP20 in Hefezellen ebenso transportiert wie in Pflanzenzellen?

2 Material und Methoden

2.1 Bakterien- und Hefestämme, Phagen und Plasmide, Pflanzenkulturen

Zur Durchführung der in dieser Arbeit beschriebenen Versuche wurden folgende Bakterienstämme (Tab. 2-1), Phagen und Plasmide (Tab. 2-2), Hefestämme und Pflanzenkulturen verwendet.

Tab. 2-1: Bakterienstämme und ihre genetischen Marken

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>A. tumefaciens</i> EHA105pEHA105		Hood <i>et al.</i> (1993)
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>deoR</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>hsdR17</i> (r_k^- , m_k^+), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , λ^- <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , $\Delta(lacZYA-argFV169)$, $\Phi80\Delta lacZ\Delta M15$, F^-	Sambrook <i>et al.</i> (1989)
<i>E. coli</i> LE392	F^- , <i>hsdR574</i> (r_k^- , m_k^+), <i>supE44</i> , <i>supF58</i> , <i>galK2</i> , <i>galT22</i> , <i>mct31</i> , <i>trpR55</i> , λ^-	Borck <i>et al.</i> (1976)
<i>E. coli</i> BL21 (DE3)	F^- , <i>ompT</i> , <i>hsdS_B</i> (r_B^- , m_B^-), <i>gal</i> , <i>dcm</i> (DE3)	Studier <i>et al.</i> (1990)
<i>E. coli</i> TOP10	F^- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\Phi80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>deoR</i> <i>recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Invitrogen/ USA (1994)

Tab. 2-2: Phagen und Plasmide

Name	Marken	Herkunft/Referenz
pBluescript II KS (-)	Amp ^r	Stratagene/USA
pYES2	Amp ^r , URA3	Invitrogen/USA
pCR2.1	Amp ^r , Kan ^r	Invitrogen/USA
pBinAR	Kan ^r	Bevan (1984)
pGPTV-bar	Kan ^r , PPT ^r	Becker <i>et al.</i> (1992)
blue-SGFP-TYG-nos SK	Amp ^r	Sheen <i>et al.</i> (1995)

Der *S. cerevisiae* Stamm C13ABYS86 (*MAT α* *leu2* *ura3* *his* *pra1* *prb1* *prc1* *cps*) (Bröker *et al.*, 1991) wurde für alle Hefetransformationen eingesetzt.

Es wurden *in vitro*- und Gewächshauspflanzen von *N. tabacum* SNN und die Tabaksuspensionskultur S-2, hergestellt aus Wurzelkallus von *N. tabacum* cv. petit Havana SR-1, verwendet (Kunze *et al.*, 1998a).

2.2 Oligonukleotide

Die Durchführung der PCR-Versuche zur Amplifikation bestimmter Teilsequenzen erfolgte mit den in Tab. 2-3 aufgeführten Oligonukleotiden.

Tab. 2-3: Verwendete Oligonukleotide

Sequenz	Name	Lage	Bemerkung
5' GAT ATC AGC AGT GCG GAA GGC AAA GGG GAG GAG CC 3'	CBP1	Position im <i>CBP20</i> -Gen + 67 bis +96	<i>CBP20</i> + <i>EcoRV</i>
5' GCA AGC TTT CTT TGT CAA CTG GGG ATA GCA GAA CAT T 3'	CBP2	Position im <i>CBP20</i> -Gen + 604 bis +633	<i>CBP20</i> + <i>HindIII</i>
5' ATG GGA AAG CTA AGT ACT CTT TTG CTT GTT CTG ATC CTC 3'	GHGFP1	Position im <i>CBP20</i> -Gen +1 bis +39	<i>CBP20</i> -Gen
5' CCA TGG GGA TCC AAG CTT ATG GGA AAG CTA AGT ACT CTT 3'	GHGFP2	Position im <i>CBP20</i> -Gen -18 bis +21	<i>CBP20</i> -Gen
5' CCA TGG AAG ATC TTT CTT TGT CAA CTG GGG ATA G 3'	GHGFP3	Position im <i>CBP20</i> -Gen komple- mentär zu +602 bis +635	<i>CBP20</i> -Gen
5' ATG AAG CTA AAA GCC GCC 3'	GHCBP1	Position im Promoter des Gens <i>CHN 50</i> -671 bis -688	<i>CBP20</i> -Promoter
5' GGC ACC TGC GGC TAT GAA ATA 3'	GHPROM1	Position im <i>CBP20</i> -Gen komple- mentär zu +37 bis +57	<i>CBP20</i> -Promoter
5' CGG TCG ACG GAT AGA AGC CGC CGA GCG GTG A 3'	GK06	Position im <i>GAL1</i> -Promoter +1 bis +32	Fusion <i>GAL1</i> - Promoter mit dem <i>NSP</i> des <i>CHN</i> -Gens
5' CTA CTG CTT TCT GCC TCG GCA GAA CCC ATG GTC CTC TAG A 3'	IK17	Position im <i>FB7-1</i> -Gen komple- mentär zu +49 bis +79	Fusion <i>GAL1</i> - Promoter mit dem <i>NSP</i> des <i>CHN</i> -Gens
5' CGG GAT CCC GGG ATG AGG CTT TGT AAA TTC ACA GCT 3'	IK02	Position im <i>NSP</i> des <i>CHN</i> -Gens +1 bis +24	Fusion <i>NSP-GFP</i> mit dem <i>VTP</i> des <i>CHN</i> -Gens
5' GGA TCC TTA CAT AGT ATC GAC TAA AAG TCG CTT GTA CAG CTC GTC CAT GCC GTG 3'	IK18	Position im <i>GFP</i> -Gen + Sequenz des <i>VTP</i> des <i>CHN</i> -Gens +711 bis +743	Fusion <i>NSP-GFP</i> mit dem <i>VTP</i> des <i>CHN</i> -Gens

2.3 Kulturmedien und Kultivierungsbedingungen

2.3.1 Medien für die Bakterienstämme

Für die Kultivierung der Bakterienstämme fanden die im Folgenden aufgeführten Medien in flüssiger oder fester Form Verwendung.

NBY: 6,75 g/l Pankreatisches Pepton
 1,75 g/l Eiweißhydrolysat
 1,50 g/l Hefeextrakt (GIBCO BRL/GB)
 5,00 g/l NaCl
 pH 7,5

LB: 32,0 g/l LB-Medium (GIBCO BRL/GB)

SOB: 2,0 % Bacto-Trypton (DIFCO/USA)
 0,5 % Hefeextrakt (GIBCO BRL/GB)
 10,0 mM NaCl
 2,5 mM KCl
 10,0 mM MgCl₂
 10,0 mM MgSO₄

YEB: 0,1 % Hefeextrakt (Duchefa/NL)
 0,5 % Beefextrakt (Duchefa/NL)
 0,5 % Pepton (Duchefa/NL)
 0,5 % Saccharose (Duchefa/NL)
 0,49 g/l MgSO₄ x 7 H₂O

Alle Medien wurden 20 min bei 121°C autoklaviert. Für Nährböden (NBY bzw. LB und YEB) wurden vor dem Autoklavieren jeweils 2 % bzw. 0,8 % Agar zugesetzt. Für selektive Medien wurde Ampicillin oder Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml bzw. 25 µg/ml nach dem Autoklavieren zugegeben.

2.3.2 Medien für die Hefestämme

Die Hefestämme wurden in flüssigem und festem YNB-Medium mit folgender Zusammensetzung kultiviert:

YNB-Medium: 33,5 mg (w/v) YNB (Yeast Nitrogen Base, w/o As und $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, GIBCO BRL/GB)

1 mg $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

10 ml 20 % Glukose oder Galaktose
gelöst in 200 ml sterilem A. dest.

1 ml Vitaminmixstammlösung

Für Nährböden wurde der Lösung vor dem Autoklavieren 2 % Bacto-Agar zugesetzt. Autoklaviert wurde für 20 min bei 121°C.

Entsprechend der genetischen Marken wurden den Medien Aminosäuren in den in Tab. 2-4 angegebenen Endkonzentrationen zugesetzt.

Vitaminmix: 40 mg Ca-D-Pantothenat
40 mg Thiamindichlorid
10 mg Nikotinsäure
40 mg Pyridoxin
0,4 mg Biotin
400 mg Inosit in 100 ml A. dest. gelöst und steril filtriert.

Tab. 2-4: Endkonzentrationen der Aminosäure- und Basensupplemente in YNB-Medium

Aminosäure	Endkonzentration [$\mu\text{g/ml}$]
Histidin	20
Leucin	30
Lysin	30
Tryptophan	20
Uracil	20

2.3.3 Medien für die Pflanzenkulturen

Die Medien für die Pflanzenkulturen wurden nach Linsmaier und Skoog (1965) bzw. Murashige und Skoog (1962) hergestellt. Das Regenerationsmedium, das nach Co-Kultivierung der Tabakexplantate verwendet wurde enthielt MS-Salze und –Vitamine, 1,6 % Glukose als C-Quelle, 0,2 mg/l NAA, 1 mg/l 6-BAP und 500 mg/l Claforan sowie je nach dem Resistenzgen des Binärvektors das Antibiotikum Kanamycin (100 mg/l) bzw. Phosphinothricin (5 mg/l).

Die Tabaksuspensionskultur S-2 wurde in den in Tab. 2-5 aufgeführten Medien kultiviert.

Tab. 2-5: Medien für die Kultivierung von Tabaksuspensionskulturen

Medium ^a	2,4D (mg/l)	NAA (mg/l)	IAA (mg/l)	Kinetin (mg/l)
LS-2	0,50	0	3,0	0,04
LS-3	0	2,0	0	0,30

^a Das Basalmedium enthält die Salze, myo-Inositol, Thiamin und Saccharose, entsprechend dem Medium nach Linsmaier und Skoog (1965).

2.3.4 Kultivierungsbedingungen und Lagerung

Alle *E. coli*-Stämme wurden bei 37°C kultiviert. Bei Flüssigkulturen wurden die Stämme in Erlenmeyerkolben auf Rundschüttlern bei 150 U/min geschüttelt.

Alle *A. tumefaciens*-Stämme wurden bei 28...30°C kultiviert. Bei Flüssigkulturen wurde wie bei *E. coli* verfahren.

Die *S. cerevisiae*-Stämme wurden bei 28...30°C kultiviert. Die Schüttelfrequenz bei Flüssigkulturen betrug 125 U/min.

In vitro-Pflanzen von *N. tabacum* SNN wurden als Sproßspitzenkulturen bei ca. 24°C im 16 h Licht-/8 h Dunkelrhythmus kultiviert.

Die Tabaksuspensionskultur S-2 wurde in LS-Medium auf einem Rotationsschüttler (70 U/min) bei ca. 23°C im Dunkeln inkubiert. Die Subkultivierung erfolgte alle 10 d.

Die Lagerung der Bakterien- und Hefestämme erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Für die Lagerung bei -20°C wurden 50%ige, für Lagerung bei -80°C 10%ige Glycerinkulturen hergestellt (Kirsop, 1988).

2.4 DNA-Isolation

2.4.1 Plasmid-DNA aus Bakterien

2.4.1.1 „Maxi-Isolation“

Das hier angewandte Verfahren beruht auf der, von Birnboim *et al.* (1979) beschriebenen Methode. 200 ml einer ÜNK von *E. coli* wurden 10 min mit 6.000xg bei 4°C zentrifugiert und die pelletierten Zellen in 5 ml Lysemedium (10 mM EDTA/ 25 mM Tris/HCl, pH 8,0/ 50 mM Glukose) auf einem „Vortexer“ gemischt. Nach Zugabe von 10 ml alkalischer SDS-Lösung (1 % SDS/ 0,2 M NaOH) wurde erneut gemischt und 7,5 ml von 3 M Na-acetat, pH 4,8 zugegeben. Nach wiederholtem Mischen erfolgte eine Inkubation bei 0°C im Eisbad für 60 min. Durch Zentrifugation bei 24.000xg und 4°C wurde das Lysat geklärt.

Der Überstand wurde dekantiert und die in ihm enthaltenen Nukleinsäuren durch Zugabe von 1 Vol. 96 % Ethanol 60 min bei -20°C ausgefällt. Nach Zentrifugation wurde das DNA-haltige Pellet in 2 ml 0,2 M Na-acetat, pH 6,0 resuspendiert und mit RNase A (Endkonzentration: 0,5 mg/ml) 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Enteiweißung durch zweimalige Phenol/Chloroform- (1:1) und einmalige Chloroform-Behandlung. Die pDNA wurde aus dem wäßrigen Überstand durch Zugabe von 96 % Ethanol innerhalb von 1 h bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 1xTE, pH 8,0 aufgenommen. Mit Hilfe dieser Methode konnten zwischen 0,5 und 3 mg pDNA isoliert werden.

2.4.1.2 „Mini-Isolation“

Das Verfahren für die „Mini-Isolation“ leitet sich von der in 2.4.1.1 beschriebenen Methode ab. Es wurden jedoch geringere Volumina eingesetzt.

Dazu wurden die transformierten *E. coli*-Zellen in 2 ml LB Medium mit Ampicillin über Nacht kultiviert und anschließend in Eppendorfreaktionsgefäßen abzentrifugiert. Die pelletierten Zellen wurden in 100 µl Lysemedium suspendiert. Nach Zugabe von 200 µl alkalischer SDS-Lösung und kurzer Inkubation bei Raumtemperatur wurden 150 µl 3 M Na-acetat, pH 4,9 zugesetzt. Die gesamte Suspension wurde abzentrifugiert und der Überstand mit 1 Vol. Phenol/Chloroform (1:1) enteiweißt. Die pDNA der wäßrigen Phase wurde mit 2 Vol. 96 % Ethanol 15 min bei -20°C gefällt, abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, 8 min in der Speedvac getrocknet und in 25 µl

1xTE, pH 8,0 mit 0,2 mg/ml RNase A gelöst. Mit dieser Methode konnten 5-30 µg pDNA pro Ansatz isoliert werden.

2.4.2 Isolation von Phagen-DNA

Phagen-DNA wurde nach einer von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode isoliert. Dazu wurden ca. 30.000 pfu 20 min in 10 mM MgSO₄ mit *E. coli* LE 392 inkubiert, anschließend 9 ml TOP-Agar (23,0 g NZC TOP Agar (GIBCO/GB) + 2,5 g MgSO₄/1 l A. dest.) dazugegeben, alles auf LB-Agar Platten (d=20 cm) verteilt und über Nacht bei 37°C, bis zur vollständigen Lyse, bebrütet. Anschließend wurden auf jede Platte 50 ml SM-Medium (100 mM NaCl/10 mM MgSO₄/20 mM Tris, pH 7,6 und 0,01 % Gelatine) pipettiert und die Platten für 2 h bei Raumtemperatur langsam auf einem Celloshaker (CHEMITRON/Italien) bewegt. Die Phagensuspension wurde abgenommen und zusammen mit 1 ml Chloroform in einem Erlenmeyerkolben 30 min bei 37°C geschüttelt, um die Phagen von den Zellen und LB-Medium abzulösen. Alles wurde anschließend bei 8.000xg für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Zu dem phagenhaltigen Überstand wurde DNase I und RNase A in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zugegeben und 30 min bei 37°C geschüttelt, um die bakterielle DNA und RNA zu verdauen. Nach einer Zentrifugation bei 8.000xg für 10 min bei 4°C wurden dem klaren Überstand festes NaCl (Endkonzentration 1 M) und PEG 8000 (Endkonzentration 10 %) zugegeben und die Phagen innerhalb von 2 h im Eisbad ausgefällt, die dann bei 11.000xg 10 min bei 4°C abzentrifugiert wurden. Das erhaltene Pellet wurde in 3 ml SM-Medium aufgenommen, mit 1 Vol. Chloroform geschüttelt und erneut bei 11.000xg zentrifugiert. Der wäßrige Überstand wurde mit SDS (Endkonzentration 0,5 %), EDTA (Endkonzentration 20 mM) und Proteinase P (Endkonzentration 1 µg/ml) versetzt, 1 h bei 37°C inkubiert und zur Enteiweißung zweimal mit Phenol/Chloroform (1:1) und einmal mit Chloroform behandelt.

Aus dem erhaltenen Überstand wurde nun die Phagen-DNA mit 1 Vol. kaltem Isopropanol bei -20°C über Nacht gefällt, abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50-100 µl A. dest. gelöst. Dabei wurden zwischen 50 und 200 µg DNA erhalten.

2.4.3 Isolation von genomischer DNA aus Blättern von Tabakpflanzen SNN

Die Präparation genomischer DNA aus Blättern von Tabakpflanzen beruht auf einer Methode von Dellaporta *et al.* (1983). Blattmaterial (0,5 g Frischgewicht) wurde in flüssigem Stickstoff zu feinem Puder gemörsert und anschließend in ein SS 34-Röhrchen (Nalgene/USA) überführt. Nach Zugabe von 5 ml Extraktionspuffer (100

mM Tris-HCl, pH 8,0/500 mM NaCl/10 mM β -Mercaptoethanol/50 mM EDTA, pH 8,0) und schütteln, wurden 0,5 ml 20 % SDS zugegeben und 10 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Probe mit 1 ml 5 M Kaliumacetat gemischt und 20 min im Eisbad abgekühlt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 8.000 U/min wurde der Überstand mit 4 ml Isopropanol versetzt und 30 min bei -20°C gefällt. Die präzipitierte DNA wurde durch Zentrifugation für 15 min bei 8.000 U/min vom Überstand getrennt und getrocknet. Das Pellet wurde anschließend in 0,7 ml A. dest. resuspendiert und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Es wurden 100 μ l 5 M Ammoniumacetat und 500 μ l Isopropanol zugegeben und noch einmal 30 sec bei 14.000 U/min zentrifugiert und das erhaltene Pellet getrocknet. Dieses wurde in 100 μ l A. dest. resuspendiert und enthielt die genomische DNA.

2.5 Restriktion von DNA

Es wurden Restriktionsenzyme von BOEHRINGER/Deutschland und AGS/Deutschland sowie die dazugehörigen, vom Hersteller mitgelieferten Puffer verwendet.

Für analytische Restriktionen wurden 0,5-1 μ g DNA mit 2-4 U Restriktionsendonuklease in 15-20 μ l Gesamtvolumen 16 h bei 37°C inkubiert.

Für präparative Spaltungen wurden bis zu 10 μ g DNA mit 10-20 U Enzym in einem Gesamtvolumen von 150 μ l verwendet.

2.6 Agarose-Gelelektrophorese zur Trennung von DNA-Fragmenten

Die Auftrennung, der bei den Restriktionen erhaltenen Fragmente, erfolgte sowohl zu analytischen, als auch zu präparativen Zwecken, in horizontalen Agarosegelen. Dabei wurde 1xTBE (90 mM Tris/90 mM Borsäure/2 mM EDTA) als Puffer verwendet. Der Agarosegehalt betrug, je nach Größe der zu trennenden Fragmente, zwischen 0,4 % (Fragmente > 10 kbp) und 1,5 % (Fragmente < 800 bp). Zur Sichtbarmachung der DNA unter UV-Licht wurde der Agarose Ethidiumbromid, in einer Konzentration von 0,3 μ g/ml, zugesetzt.

2.7 Isolation von DNA-Fragmenten

Für die Isolation von Fragmenten aus Agarosegelen wurde der Qiagen Kit (QIAGEN/Deutschland) verwendet. Es wurde nach den Angaben des Herstellers verfahren.

2.8 Ligation von DNA

Die Ligation von DNA, mit überhängenden oder glatten Enden, wurde nach einer Methode von Sambrook *et al.* (1989) durchgeführt. Bei DNA mit gleichen 5'-überhängenden Enden wurde vor der Ligation eine Phosphatasebehandlung des Vektors durchgeführt, um die Selbstligation zu vermindern. Enzyme und dazugehörige Puffer stammten von BOEHRINGER/Deutschland.

2.9 Sequenzierung der Nukleotidsequenzen

Alle Sequenzierungen erfolgten nach der Didesoxy-Kettenabbruchreaktion (Sanger *et al.*, 1977), die am IPK zentral durchgeführt wurde. Dabei erfolgte die Bestimmung der Nukleotidsequenzen mit Hilfe des AutoRead™ Sequencing Kits (PHARMACIA/Schweden) an einem A.L.F.™ DNA Sequencer (PHARMACIA/Schweden). Alle, für die Sequenzierung eingesetzten DNA-Fragmente, waren dazu in pBlue-script II KS (-) oder den pCR2.1-Vektor kloniert worden. Die Sequenzierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.10 Southern-Hybridisierung

2.10.1 Transfer von gelelektrophoretisch getrennten DNA-Fragmenten auf Träger-

material

Die DNA wurde in horizontalen Agarosegelen aufgetrennt und mittels Vakuumblot (Vakublot; BIOMETRA/Deutschland), entsprechend der vom Hersteller vorgegebenen Schritte, auf NC-Membran (Hybond N; AMERSHAM/GB) übertragen.

2.10.2 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten mit α -[³²P]dATP

Für die radioaktive Markierung von DNA-Proben mit α -[³²P]dATP wurde der Random Primer Labelling Kit (GIBCO/GB) gemäß der Vorschrift des Herstellers verwendet. Es wurde zunächst die DNA denaturiert, ein „Random“-Oligonukleotidgemisch, die dNTPs (dATP in Form von α -[³²P]dATP) und das Klenow-Fragment zugegeben und alles für 3 h bei 30°C inkubiert. Das Oligonukleotidgemisch wird von dem Klenow-Fragment als unspezifischer Primer für die Synthese der komplementären, radioaktiv markierten DNA-Stränge genutzt (Feinberg und Vogelstein, 1983).

2.10.3 DNA-Hybridisierung

Die Hybridisierungen mit radioaktiv markierten Sonden wurden, nach der von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode, durchgeführt. Dazu wurden die mit DNA beladenen Membranen zunächst 3 h in Vorhybridisierungslösung (0,25 % w/v Magermilchpulver/4xSSC/0,1 % SDS), bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur, inkubiert.

Danach wurde die Lösung gegen 3 ml frische Vorhybridisierungslösung ausgetauscht und die radioaktive, denaturierte DNA zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 16-18 h. Zur Nachbehandlung wurden die Filter bei der gleichen Temperatur zweimal für je 15 min mit 4xSSC/0,1 % SDS, zweimal für je 15 min mit 2xSSC/0,1 % SDS und einmal für 15 min mit 0,1xSSC/0,1 % SDS gewaschen. Anschließend wurden die noch feuchten Filter getrocknet, in Folie eingeschweißt und bei -80°C zur Autoradiographie ausgelegt.

2.11 RNA-Isolation

2.11.1 RNA-Isolation aus Tabaksuspensionen

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurden die Zellen durch Filtration vom Medium getrennt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurden die Zellen durch Mörsern in flüssigem Stickstoff aufgebrochen und nach Zugabe von RNA-Extraktionspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 9,5/0,1 M NaCl/2 % SDS/200 mM β -Mercaptoethanol) im Eisbad langsam aufgetaut. Nach Mischen auf dem „Vortexer“ wurde bei 15.800xg und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend je einmal mit 1 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) und 1 Vol. Chloroform/Isoamylalkohol (50:1) enteiweißt. Die RNA aus der wäßrigen Phase wurde durch Zugabe von 1/10 Vol. 3 M Na-acetat, pH 5,2 und 1 Vol. gekühlten Isopropanol bei -80°C über Nacht ausgefällt, abzentrifugiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, im Exsiccator getrocknet und in 25-50 μ l DEPC-behandeltem A. dest. gelöst.

2.11.2 RNA-Isolation aus Blättern von *in vitro*-Pflanzen des Tabak

Die Isolation der Gesamt-RNA aus Pflanzen von *N. tabacum* SNN beruht auf einer modifizierten Methode von Logemann *et al.* (1987). Hierzu wurden ca. 100 mg Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren und die Zellen durch Mörsern mit Guanidinhydrochlorid-Extraktionspuffer (8 M Guanidinhydrochlorid/20 mM Mes/20 mM EDTA/50 mM β -Mercaptoethanol, pH 7,0) aufgeschlossen. Nach Zuga-

be von 0,5 Vol. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurde auf dem „Vortexer“ gemischt und 5 min bei 15.800xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Die RNA wurde anschließend durch Zugabe von 0,2 Vol. 1 M Essigsäure und 0,7 Vol. 96 % Ethanol bei -80°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation wurde die RNA mit 3 M Na-acetat, pH 5,2 und danach mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-50 µl DEPC-behandeltem A. dest. gelöst. Mit dieser Methode konnten bis zu 500 µg RNA/1 g Pflanzenmaterial gewonnen werden.

2.12 Formaldehyd-Agarose Gelelektrophorese zur Trennung von RNA

Für die gelelektrophoretische Trennung der RNA, nach der bei Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode, erfolgte deren Denaturierung in einem Formamid/Formaldehyd-Puffer (40 % Formamid/3,7 % Formaldehyd/20 mM MOPS/8 mM Na-acetat/0,5 mM EDTA) durch Inkubation für 15 min bei 65°C. Danach wurden die Proben im Eisbad abgekühlt, kurz zentrifugiert, mit Ethidiumbromid versetzt und auf ein Agarosegel aufgetragen.

Dazu wurden 1,5 % Agarosegele mit 5 % Formaldehyd verwendet. Als Laufpuffer diente 1xMEN (20 mM MOPS/8 mM Na-acetat/0,5 mM EDTA).

2.13 Northern-Hybridisierung

RNA, die wie unter 2.12 beschrieben, getrennt worden war, wurde durch Kapillarttransfer, nach einer modifizierten Methode von Fourny *et al.* (1988), auf eine NC-Membran (GeneScreen; DUPONT/USA) übertragen. Dazu wurde das Gel viermal für je 5 min in DEPC-behandeltem A. dest. gespült und die auf Gelgröße geschnittene NC-Membran mit DEPC-behandeltem A. dest. angefeuchtet und 15 min in 20xSSC gelegt. Anschließend wurde das Gel in der Transferkammer mit der Unterseite nach oben auf mit 10xSSPE (1,5 M NaCl/0,1 M NaH₂PO₄/0,01 M EDTA, pH 7,4) getränktes Gelblotting-Papier gelegt. Auf das Gel wurde die vorbehandelte NC-Membran plaziert und darüber einige Lagen Gelblotting-Papier und stark saugfähiges Filterpapier gelegt. Dieser Aufbau wurde mit einer Glasplatte abgedeckt und mit einem Gewicht von 200-500 g beschwert. Mit 10xSSPE als Laufmittel wurde die RNA innerhalb von 16 h auf die NC-Membran transferiert. Die RNA-beladene Membran wurde kurz in 2xSSC geschwenkt, luftgetrocknet und zur Fixierung der RNA für 3 min mit UV-Licht bestrahlt. Danach wurde der Filter entweder zur Hybridisierung verwendet oder bei -20°C gelagert.

Zur Hybridisierung wurden die Filter zunächst in einer Hybridisierungslösung (5xSSPE/50 % Formamid/5xDenhardts/1 % SDS) für 3 h bei 42°C vorhybridisiert. Anschließend wurde die Lösung durch 2,5 ml frische Hybridisierungslösung ersetzt und die denaturierte, radioaktiv markierte Sonde zugegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 42°C für 16-18 h. Danach wurden die Filter in 2xSSPE für je 15 min bei Raumtemperatur, einmal in 2xSSPE/2 % SDS für 45 min bei 65°C und einmal in 0,1xSSPE für 15 min bei Raumtemperatur gewaschen, getrocknet, in Folie eingeschweißt und bei -80°C zur Autoradiographie ausgelegt.

2.14 Protein-Extraktion

2.14.1 Extraktion von Gesamt-Protein mit TNT-Puffer

Für die Extraktion von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial (sowohl Zellen aus Suspensionskulturen als auch aus Pflanzenteilen) wurde die Probe in flüssigem Stickstoff eingefroren und gemörst. Das dabei erhaltene Pulver wurde in ein Zentrifugegefäß überführt und nach Zugabe von 5 Glaskugeln ($d=0,5$ cm) und ca. 1 ml/g FG TNT-Extraktionspuffer (500 mM NaCl/0,02 % Triton X100/50 mM Tris-HCl, pH 8,0) wurde alles für 3 min „gevortext“. Nach Zentrifugation für 15 min bei 34.000xg wurde der Überstand mit TNT-Puffer auf sein Originalvolumen aufgefüllt.

2.14.2 Isolation von zellwandständigen Proteinen

Suspensionskulturen wurden für diesen Zweck durch einen Papierfilter (NIEDERSCHLAG/Deutschland) mit einer Porenweite von 56 μ m vom Medium getrennt und zur Entfernung der Restflüssigkeit auf Fließpapier kurz getrocknet. Anschließend wurden je 3 g Zellen bzw. Blattmaterial mit 2 g Quarzsand gemörst, bis die Zellen aufgeschlossen waren (Kontrolle unter dem Mikroskop). Nun wurden die Zellen mit 15 ml 0,4 M Saccharose in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 5 Glaskugeln ($d=0,5$ cm) 3 min „gevortext“. Nach Zentrifugation für 15 min bei 1.000xg wurde das Pellet in 15 ml 0,6 M Saccharose resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 1.000xg wurde das Pellet in 15 ml 1 M Saccharose gelöst und im Anschluß wurde das Pellet nach Zentrifugation noch dreimal mit je 15 ml sterilem Wasser gewaschen. Nun erfolgte die Extraktion – sofern nicht anders beschrieben - mit 10 ml 3 mM Na(P)-Puffer, pH 7,5/1 M NaCl unter Rühren bei 4°C über Nacht. Die folgende Zentrifugation wurde für 10 min bei 6.000xg durchgeführt und der Überstand, welcher die extrahierten Zellwand-Proteine enthält, durch Ultrafiltration mit Hilfe einer Centricell-Einheit (MILLIPORE/Deutschland) aufkonzentriert.

2.15 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die PAGE wurde die Protean II Apparatur von BioRad/USA verwendet.

Dazu wurden die folgenden Stammlösungen angesetzt:

10xTBE: 108 g Tris
 55 g Borsäure
 9,3 g Na₂-EDTA x H₂O in 1 l deionisiertem H₂O gelöst und
 autoklaviert.
 pH 8,3

AA:MBA = 40 % : 2,1 %:

200 g Acrylamid
 10,5 g Methylen-bis-acrylamid
 mit deionisiertem H₂O auf 500 ml aufgefüllt, gelöst und steril
 filtriert.

10 % Ammoniumpersulfat (w/v), für jedes Gel frisch zubereitet.

10 % TEMED (Tetramethylethylendiamin), für jedes Gel frisch zubereitet.

Es wurden 11-20%ige PAA-Gradientengele verwendet, deren Zusammensetzung aus der Tab. 2-6 zu entnehmen ist.

Tab. 2-6: Zusammensetzung der verwendeten PAA-Gele

Komponente	PAA-Gel	
	11 %	20 %
AA:MBA = 40 : 2,1	4,4 ml	8,5 ml
1 M Tris, pH 8,8	6,8 ml	6,8 ml
20 % SDS	90 µl	90 µl
10 % TEMED	180 µl	180 µl
10 % Ammoniumpersulfat	180 µl	180 µl
Deionisiertes Wasser	5,6 ml	2,5 ml

2.16 Westernblotexperimente

2.16.1 Transfer von gelelektrophoretisch getrennten Polypeptiden auf Trägermaterial

Für den Transfer, der in der SDS-PAGE aufgetrennten Polypeptide auf ein Trägermaterial, wurde die Methode nach Towbin *et al.* (1979) genutzt. Hierzu wurden die Polypeptide durch Elektrotransfer in einer Blotapparatur (BioRad/USA) aus dem PAA-Gel auf eine PVDF-Membran (ROTH/Deutschland) bei 100 mA über Nacht übertragen.

2.16.2 Antikörperbehandlung

Die mit Proteinen beladenen PVDF-Membranen wurden nach dem Transfer 1 h in 1xTBS-Puffer (150 mM NaCl/20 mM Tris-HCl, pH 7,5) mit 0,5 % Tween 20 bei 30°C unter Schütteln, zum Zwecke der Blockierung, inkubiert. Danach wurde als primärer Antikörper, der für den jeweiligen Nachweis spezifische Antikörper verwendet. Die Verdünnung der AK lag zwischen 1:2000 und 1:5000. Die Inkubation erfolgte für 2 h bei 30°C unter leichtem Schütteln (Celloshaker; Chemitron/Italien). Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1xTBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20 für jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen, bevor sich eine zweistündige Inkubation bei 30°C mit dem sekundären Antikörper anschloß. Als sekundärer Antikörper wurde ein mit alkalischer Phosphatase konjugierter Anti-Kaninchen-IgG Antikörper in einer Verdünnung von 1:7500 verwendet. Nach erneutem Waschen mit 1xTBS-Puffer mit 0,1 % Tween 20 erfolgte der Nachweis der Protein-Antikörper-Bindung mit Hilfe von „Western Blue Stabilized Substrat“ (PROMEGA/Deutschland). Die Antikörper wurden alle in 1xTBS-Puffer mit 0,02 % Natriumazid verdünnt.

2.16.3 Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran

Zur Färbung der Proteine auf der PVDF-Membran wurde Amido Black 10 B (Merck/Deutschland) verwendet. Dazu wurde die Membran in einer 5%igen (w/v) Amido Black Lösung (50 % (v/v) Methanol/5 % (v/v) Essigsäure in deionisiertem Wasser) 3-15 min inkubiert und anschließend mit 50 % (v/v) Methanol/5 % (v/v) Essigsäure in deionisiertem Wasser entfärbt.

2.16.4 Sequenzierung des N-Terminus von Polypeptiden

Hierzu wurden die Proteine in einer SDS-PAGE getrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Die Membran wurde anschließend mit Amido Black 10 B gefärbt und die gefärbten Polypeptidbanden unseres Interesses ausgeschnitten. Diese wurde dann in einem Sequenzierer (Modell LF 3400, BECKMAN/USA) unter Nutzung eines Spezialprogrammes für PVDF-Membranen analysiert.

Für die N-terminale Sequenzierung von CBP20 mußte zuvor die N-terminale Aminosäure (Glutaminsäure) mit Pyroglutamylpeptidase (BOEHRINGER/Deutschland) deblockiert werden. Hierzu wurde die Methode nach Hirano *et al.* (1991) angewendet. Dazu wurde die entsprechende PVDF-Bande ausgeschnitten und in 100 mM Essigsäure/0,5 % Polyvinylpyruvat 40.000 für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit je 500 µl A. dest. 10 mal gewaschen und dann in 0,1 M Na(P)-Puffer, pH 8,0/5 mM DTT/10 mM EDTA eingeweicht. Nach Zugabe von 5 µg Pyroglutamylpeptidase erfolgte eine weitere Inkubation für 24 h bei 30°C. Nach nochmaligem Waschen mit A. dest. wurde die PVDF-Membran getrocknet und zum Sequenzieren gegeben.

2.17 „Pulse-Chase“-Experimente

Für die „Pulse-Chase“-Experimente wurden Aliquote von je 1 g gewaschener Zellen in 5 ml Medium nach Linsmaier und Skoog (1965), ohne Wachstumsregulatoren, mit 15 Mbq L-³⁵S-Methionin/Cystein (PROMIX, spezifische Aktivität 37 Tbq/mmol, AMERSHAM/GB) für 1 h markiert. Für den „Chase“ wurden die Zellen filtriert, in 5 ml frisches Medium mit 1 mM Methionin und 50 µM Cystein überführt und für 0, 1, 3, 6 und 20 h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen filtriert und Aliquote des Kulturmediums (500 µl) mit 1/10 Vol. 10xPuffer E (50 mM EDTA/1,5 M NaCl/500 mM Tris-HCl, pH 7,4) gemischt und mit Anti-CBP20 bzw. Anti-GLN, nach der Methode von Klionsky *et al.* (1988), bei 4°C über Nacht immunoabsorbiert. Für die Zellextraktion wurden zu den Zellen 3 Glaskugeln (d=0,5 cm) und 400 µl 1xPuffer E (150 mM NaCl/5 mM EDTA/50 mM Tris-HCl, pH 7,4) gegeben und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Auftauen wurde 3 min „gevortext“ und wieder eingefroren. Anschließend wurde dieser Schritt noch einmal wiederholt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 15.800xg wurden 200 µl des Überstandes mit 300 µl Puffer E gemischt und dann mit den Antikörpern bei 4°C über Nacht immunoabsorbiert. Nach der Immunoabsorption wurden die Antigen-Antikörper-Komplexe an Protein A Sepharose (CL-4B; PHARMACIA/Schweden), während einer Inkubation für 2 h bei 30°C, gebunden.

Anschließend wurde zentrifugiert und das Pellet zweimal mit Puffer B (1 % Triton X-100/0,2 % SDS/150 mM NaCl/5 mM EDTA/50 mM Tris-HCl, pH 7,4) und einmal mit 1xPuffer E gewaschen. Das Pellet wurde in 30 µl Probenpuffer nach Laemmli (1970) aufgenommen und 5 min gekocht, um die Proteine abzulösen. Dann wurde der Überstand in einer SDS-PAGE aufgetrennt und die markierten Proteine durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

2.18 Transformationen

2.18.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* DH5 α wurde in modifizierter Form nach Hanahan (1983) durchgeführt. Dazu wurden DH5 α -Zellen in 200 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5-1 kultiviert. Nach Abkühlung der Zellen für 15-30 min im Eisbad erfolgte eine Zentrifugation bei 4.000xg für 15 min. Das Pellet wurde in 1 l E-Lösung (272 mM Saccharose/7 mM KH₂PO₄ pH 7,0/1 mM MgCl₂) resuspendiert und anschließend für 15 min bei 4.000xg zentrifugiert. Nach Resuspendierung des Pellets in 0,5 l E-Lösung wurde wieder zentrifugiert und das Pellet in 20 ml E-Lösung + 10 % Glycerin aufgenommen. Die Zellkonzentration nach diesem Schritt sollte 1-3 x 10¹⁰ Zellen/ml betragen. Nun wurden Aliquots zu je 40 µl in Eppendorfgefäße abgefüllt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und konnten nun für die Transformation eingesetzt oder bei -80°C für 6 Monate aufbewahrt werden. Für die Transformation wurde ein 40 µl Aliquot der Zellen im Eisbad aufgetaut und 10 µl dialysierte DNA dazugegeben. Es wurde alles vorsichtig gemischt und in eine 0,2 cm Elektroporationsküvette eingefüllt. Die Elektroporation erfolgte in einem Porationsgerät (25 µF, 2,5 kV, 200 Ohm; BioRad/USA) für 4-5 msec. Nach Zugabe von 1 ml SOB + 20 mM Glukose wurden die Zellen 1 h bei 37°C inkubiert. Pro LB-Platte mit Ampicillin (50 µg/ml Endkonzentration) wurden je 100-200 µl der transformierten Zellen ausplattiert und für 16-20 h bei 37°C bebrütet.

2.18.2 Transformation von *A. tumefaciens*

Der Stamm EHA105pEHA105 wurde in 50 ml YEB-Medium (16 g/l Trypton/10 g/l Hefeextrakt/5 g/l NaCl, pH 7,5) bei 28°C 24-30 h bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6 kultiviert. Nach Abkühlung der Zellen im Eisbad wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 4.000xg pelletiert. Anschließend wurden die Zellen nacheinander mit 1; 0,5; 0,2 und 0,02 Vol. eiskaltem 10%igen Glycerin gewaschen. Nach Resuspendierung der Zellen in 0,01 Vol. 10%igem Glycerin erfolgte ihre Aliquotierung zu je 40 µl. Die

Aliquote konnten bei -80°C bis zur Elektroporation gelagert werden. Für die Transformation wurde ein Aliquot der Zellen im Eisbad aufgetaut und mit 10 µl dialysierter DNA versetzt. Es wurde alles vorsichtig gemischt und in eine gekühlte 0,2 cm Elektroporationsküvette eingefüllt. Die Elektroporation erfolgte in einem Porationsgerät (25 µF, 2,5 kV, 200 Ohm; BioRad/USA) für 4-5 msec. Nach Zugabe von 1 ml YEB + 20 mM Glukose wurden die Zellen 3 h bei 28°C inkubiert. Pro YEB-Platte mit Kanamycin (25 µg/ml Endkonzentration) wurden je 100-200 µl der transformierten Zellen ausplattiert und für 2 d bei 28...30°C bebrütet.

2.18.3 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefe wurde nach der Methode von Dohmen *et al.* (1991) durchgeführt. Dazu wurden die Hefen in YNB-Medium bis zu einer OD₆₀₀ = 0,6-1 kultiviert, zentrifugiert und mit 0,5 Vol. einer Lösung (1 M Sorbit/10 mM Bicine-NaOH, pH 8,35/3 % Ethylenglycol/5 % DMSO) gewaschen. Nach Zentrifugation wurden die Zellen in 0,02 Vol. der gleichen Lösung resuspendiert und Aliquote zu je 200 µl bei -80°C eingefroren.

Für die Transformation wurden 5 µl DNA zu den gefrorenen Zellen gegeben und 5 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 1,4 ml PEG 1000/0,2 M Bicine-NaOH, pH 8,35 wurde vorsichtig gemischt und die Zellen zu 30°C für 1 h gestellt. Nach einer 5 minütigen Zentrifugation bei 3.000xg wurde das Pellet mit 1,6 ml 0,15 M NaCl/10 mM Bicine-NaOH, pH 8,35 gewaschen, zentrifugiert und das Pellet in 1 ml der gleichen Lösung aufgenommen. Pro YNB-Platte mit den entsprechenden Aminosäuresupplementen wurden je 150 µl der transformierten Zellsuspension ausplattiert und bei 28...30°C für 2-3 d bebrütet.

2.18.4 Agrobakterien-vermittelte Transformation von *N. tabacum*

Die Transformation von Tabakpflanzen wurde nach einer Methode von Rosahl *et al.* (1987) durchgeführt. Dazu wurde eine 50 ml Bakterien-ÜNK in YEB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin zentrifugiert (10 min bei 6.000 U/min) und in 50 ml frischem YEB-Medium resuspendiert. Junge Tabakblätter wurden nach Entfernung der Mittelrippe in ca. 1 cm² große Stücke geschnitten und anschließend 10 min mit der Bakterienkultur durch Schwenken benetzt. Dann wurden die Blattstücken auf festes MS-Medium mit 2 % Saccharose gelegt und für 2 d im Dunkeln inkubiert. Danach wurden die Blattstücken auf Selektionsmedium (MS-Medium mit 1,6 % Glukose/500 mg/l Claforan/1 mg/l BAP/0,2 mg/l NAA/100 mg/l Kanamycin bzw. 5 mg/l Phosphinothricin) umgelegt. Das Medium wurde aller 10-14 d erneuert. Nach Ausbildung

von Sproßknospen bzw. kleinen Sprossen wurden die Explantate auf MS-Medium mit 2 % Saccharose und 500 mg/l Claforan und je nach Resistenzgen des Binärvektors mit je 5 mg/l Phosphinothricin oder 100 mg/l Kanamycin gelegt. Für die Bewurzelung und Erhaltung der Pflanzen wurden Spitzenstecklinge in MS-Medium mit 2 % Saccharose und 500 mg/l Claforan kultiviert.

2.19 Untersuchungen zur Akkumulation von CBP20 in Tabaksuspensionskulturen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit

Die Zellsuspensionskultur S-2 (Kunze *et al.*, 1998) wurde in je 20 ml LS-Medien mit unterschiedlichen Wachstumsregulatoren kultiviert (siehe Tab. 2-5). Nach 10 d wurden ca. 4 ml der Kultur mit einem sterilen Spatellöffel in frisches Medium überführt und bei 24°C auf einer Schüttelmaschine bei 70 U/min im Dunkeln kultiviert. Für unsere Versuche wurden 6-8 d alte Vorkulturen genutzt. Diese wurden durch einen Nylonfilter mit einer Porenweite von 56 µm filtriert und mit 400 ml Medium ohne Wachstumsregulatoren gewaschen. Anschließend wurden jeweils parallele Proben, mit 2 g Zellen (Frischgewicht), in 10 ml des jeweiligen Mediums gegeben und bei 70 U/min im Dunkeln kultiviert. Nach den entsprechenden Zeiten wurden die Zellen vorsichtig durch Filtrieren durch Filterpapier (Filtrak 388, NIEDER-SCHLAG/Deutschland) vom Medium getrennt und die Zellen wie unter 2.14.1 beschrieben weiter behandelt. Anschließend wurden 5 ml des Kulturmediums durch Ultrazentrifugation mit Centricell (MILLIPORE/USA) 10fach konzentriert.

2.20 Bestimmung von Enzymaktivitäten

2.20.1 α -Mannosidase (E.C. 3.2.1.24)

Die α -Mannosidase wurde als Marker für vakuoläre Enzyme genutzt und nach der Methode von Faber und Glew (1984) bestimmt, wobei *p*-Nitrophenyl- α -mannopyranosid als Substrat genutzt wurde.

2.20.2 Malatdehydrogenase (E.C. 1.1.1.37)

Die Malatdehydrogenase ist hauptsächlich in den Mitochondrien und dem Cytosol lokalisiert (Kaiser *et al.* 1982; Thom *et al.* 1982) und wurde als innerzelluläres Markerenzym verwendet. Die Malatdehydrogenaseaktivität wurde durch die Messung der Reduktion von NADH bei 340 nm in 30 sec-Intervallen über einen Zeitraum von

3 min bestimmt. Die Meßprobe hatte ein Volumen von 1,1 ml und enthielt 0,45 mM NADH und 0,72 mM Oxalessigsäure in Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0.

2.20.3 β -Glukuronidase (E.C. 3.2.1.31)

Der Nachweis der β -Glukuronidase wurde nach der Methode von Jefferson *et al.* (1987) durchgeführt. Dazu wurde das Pflanzenmaterial mit 1 mg/ml 5-Bromo-4-chlor-3-indolyl β -D-Glucuronide-Natriumsalz, pH 7,0 über Nacht inkubiert und die Bildung des blauen Farbstoffkomplexes analysiert.

2.21 Screening von Phagenbanken

Das Screening der Phagenbanken wurde nach der von Sambrook *et al.* (1989) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurden 10^9 *E. coli* LE392 Zellen mit 3-4000 pfu der entsprechenden Phagenbank für 20 min bei 37°C infiziert, in 9 ml verflüssigtem TOP-Agar auf LB-Platten (d=20 cm) verteilt und für 16 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Phagen-DNA auf NC-Membran (Hybond N; AMER-SHAM/GB) übertragen und diese nacheinander 5 min in 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl, 5 min in 1,5 M NaCl/0,5 M Tris-HCl, pH 7,4 und 20 min in 20xSSC (3 M NaCl/0,2 M NaH_2PO_4 /20 mM EDTA, pH 7,4) inkubiert, luftgetrocknet, 3 min durch Verwendung eines „Cross Linkers“ fixiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden wurde, wie unter 2.10.3 beschrieben, durchgeführt.

2.22 Subklonierung von CBP20 und Expression in *E. coli*

Um unsere Untersuchungen zur Expression auch auf Proteinebene durchführen zu können, benötigten wir einen Antikörper, der gegen CBP20 gerichtet ist. Hierzu sollte das Gen in *E. coli* überführt und exprimiert werden, um dann nach Isolation und Aufreinigung für die Immunisierung von Kaninchen eingesetzt werden zu können.

Um den cDNA-Klon *CBP20/4* in den Vektor pET29c (Novagen/USA) klonieren zu können, mußten zuvor an das Gen die Restriktionsorte *EcoRV* und *HindIII* mittels *in vitro*-Mutagenese angefügt werden. Die beiden Oligonukleotide CBP1 und CBP2 (siehe Tab. 2-3) und die pBluescript SK (-)-*CBP20*-cDNA als „Template“ wurden für die PCR eingesetzt. Das *EcoRV*-*HindIII*-Fragment mit dem *CBP20-ga*-Gen wurde in das Plasmid pET29c (pET29c-CBP20) eingefügt und in den *E. coli*-Stamm BL21 (DE3), nach den Herstellerangaben, transformiert. Das in *E. coli* synthetisierte und

akkumulierte CBP20 Protein wurde, nach den Angaben des Herstellers, aus den "Inclusion-Bodies" der *E. coli*-Transformanten isoliert. Ca. 10 % des Gesamtprotein-gehaltes der "Inclusion-Bodies" enthielten CBP20. Dieses wurde als Antigen für die Herstellung von Antikörpern eingesetzt.

2.23 Promotorisolation, Klonierung der Genfusion Promotor+GUS und Transformation in den Agrobakterienstamm EHA105pEHA105

Für die Isolation des Promotors des *CBP20*-Gens wurde eine PCR durchgeführt, bei der die beiden folgenden Oligonukleotide GHCBP1 und GHPRM1 sowie chromosomale DNA von *N. tabacum* SNN als „Template“ verwendet wurden. Oligonukleotid GHCBP1 (Tab. 2-3) ist eine für Promotoren von PR-Proteinen typische Sequenz und Oligonukleotid GHPRM1 (Tab. 2-3) wurde vom 5'-Ende des *CBP20*-Gens gewählt. Das resultierende PCR-Produkt wurde in das Plasmid pCR2.1 (Invitrogen/USA), nach den Angaben des Herstellers, kloniert. Das *HindIII/XbaI*-Fragment mit der Promotorsequenz wurde in das Plasmid pGPTV-bar unmittelbar vor das β -Glukuronidase-Gen (GUS) kloniert. Die Transformation des Plasmides in den Agrobakterienstamm EHA105pEHA105 wurde, nach der in Abschnitt 2.18.4 beschriebenen Methode, durchgeführt und auf Phosphinothricinresistenz selektiert.

2.24 Klonierung von „sense“- und „antisense“-Konstrukten von *CBP20* und Transformation in den Agrobakterienstamm EHA105pEHA105

Für die Herstellung von „sense“- und „antisense“-Konstrukten von *CBP20* wurde das *BamHI/BglII*-restringierte Gen *CBP20* in beiden Orientierungen in den *BamHI*-restringierten binären Vektor pBinAR vor dem CaMV 35S-Promoter kloniert. Die Transformation des Plasmides in den Agrobakterienstamm EHA105pEHA105 wurde, nach der in Abschnitt 2.18.4 beschriebenen Methode, durchgeführt und auf Kanamycinresistenz selektiert.

2.25 Klonierung der Genfusion *CBP20-GFP* und Transformation in den Hefestamm CI3ABYS86

Das Gen des grünen fluoreszierenden Proteins (GFP) lag uns als synthetisch hergestelltes Gen mit einer Punktmutation in Position 65 (S65T) im Vektor pBluescript SK (-) vor (Sheen *et al.*, 1995). Zur Klonierung wurde das *NcoI*-restringierte Fragment mit dem *GFP*-Gen in pBluescript KS (-) mit dem *NcoI*-restringierten 700 bp-

Fragment von *CBP20* ligiert, wie unter 2.18.1 beschrieben, in *E. coli* transformiert und auf Ampicillinresistenz selektiert. Von den positiven Transformanten wurde die Plasmid-DNA isoliert und zur Kontrolle mit *Bam*HI restringiert. Das dabei erhaltene Fragment von 1,4 kbp entsprach der theoretischen Größe des Fusionsgens. Weiterhin wurde zur Kontrolle mit M13 Uni- und M13 Revers-Primern sequenziert. Der Sequenzvergleich mit dem 5'-Ende von *CBP20* und dem 3'-Ende des *GFP*-Gens zeigte eine 100%ige Übereinstimmung mit den Ausgangssequenzen. Das *Bam*HI-restringierte Fragment des Fusionsgens *CBP20-GFP* wurde mit dem *Bam*HI-restringierten Yeast/*E. coli*-Shuttle-Vektor pYES2 ligiert, wie unter 2.18.1 beschrieben, in *E. coli* transformiert und auf Ampicillinresistenz selektiert. Von den positiven Transformanten wurde die Plasmid-DNA isoliert und mit *Bam*HI restringiert. Es entstand ein Fragment in der erwarteten Größe von 1,4 kbp.

Das so erhaltene Plasmid wurde, wie unter 2.18.3 beschrieben, nach der Methode von Dohmen *et al.* (1991) in den Stamm Cl3ABYS86 transformiert. Selektiert wurde auf YNB-Medium mit 2 % Glukose und den entsprechenden Supplementen, wobei Uracil als Selektionsmarker verwendet wurde.

Die Expression des Fusionsgens wurde unter die Kontrolle des *GAL1*-Promotors von *S. cerevisiae* gestellt.

2.26 Transformation von GFP in den Hefestamm Cl3ABYS86

Um das *GFP*-Gen in einen *S. cerevisiae* Stamm transformieren zu können, mußte das Gen zuerst in den Yeast/*E. coli*-Shuttle-Vektor pYES2 kloniert werden. Dazu wurde das *Hind*III/*Bam*HI-Fragment mit dem *GFP*-Gen aus pBluescript SK (-) mit dem ebenfalls *Hind*III/*Bam*HI restringierten pYES2-Vektor ligiert und wie unter 2.18.1 beschrieben, in den *E. coli*-Stamm DH5 α transformiert, wobei auf Ampicillinresistenz selektiert wurde. Nachdem die Plasmid-DNA isoliert war, wurde eine *Hind*III/*Bam*HI-Spaltung durchgeführt und es entstand ein 700 bp-Fragment, was der theoretischen Größe des *GFP*-Gens entsprach. Das so erhaltene Plasmid wurde, wie unter 2.18.3 beschrieben, nach der Methode von Dohmen *et al.* (1991) in den Stamm Cl3ABYS86 transformiert. Selektiert wurde wieder auf YNB-Medium mit 2 % Glukose mit den entsprechenden Supplementen, aber ohne Uracil.

Die Expression von GFP wurde unter die Kontrolle des *GAL1*-Promotors von *S. cerevisiae* gestellt.

2.27 Fusion des *GFP*-Gens mit *NSP*- und *VTP*-Sequenzen des *CHN*-Gens der Klasse I und Transformation in den Hefestamm CI3ABYS86

Da das *GFP*-Gen keine Signalsequenzen besitzt, sollte als Kontrolle für die korrekte Prozessierung, das Protein GFP mit den Signalpeptiden des *CHN*-Gens der Klasse I versehen. Hierzu wurde das *GFP*-Gen N-terminal mit der Sequenz für das N-terminale Signalpeptid (*NSP*) und C-terminal mit der Sequenz für das vakuoläre Targetpeptid (*VTP*) des *CHN*-Gens der Klasse I fusioniert. Die Funktionstüchtigkeit des *VTP* bezüglich des vakuolären Targetings ist von Neuhaus *et al.* (1996) untersucht worden.

Um das *GFP*-Gen mit den *NSP*- und *VTP*-Sequenzen des *CHN*-Gens der Klasse I fusionieren zu können, wurden zwei PCR-Reaktionen durchgeführt. Für die erste Reaktion wurden die Oligonukleotide GK06 und IK17 (Tab. 2-3) als Primer und das *CHN*-Gen *FB7-1* als „Template“ eingesetzt. Das resultierende *SalI/XbaI*-Fragment, welches den *GAL1*-Promotor und die Sequenz des *NSP* des *CHN*-Gens enthielt, wurde in das Konstrukt `blue-SGFP-TYG-nos KS` eingefügt. Weiterhin wurde dieses Konstrukt als „Template“ für die zweite PCR-Reaktion eingesetzt, um die *NSP-SGFP-TYG-nos*-Region mit einer *BamHI*-Schnittstelle und der *VTP*-Sequenz am 3'-Ende zu flankieren. Hierfür wurden die Oligonukleotide IK02 und IK18 (Tab. 2-3) genutzt. Alle Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft. Das so erhaltene Konstrukt wurde, wie unter 2.18.3 beschrieben, nach der Methode von Dohmen *et al.* (1991) in den Stamm CI3ABYS86 transformiert. Selektiert wurde wieder auf YNB-Medium mit 2 % Glukose wobei Uracil als Selektionsmarker diente.

2.28 Confocale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

2.28.1 Verwendete Geräte und Einstellungen

Für die Analyse des Transportes bzw. der Lokalisation des cytosolischen GFP und der GFP-Fusionsproteine wurde ein Laser Scanning Mikroskop (LSM 410 Zeiss/Deutschland) genutzt. Die Anregungswellenlänge für das von uns verwendete GFP betrug 488 nm und wurde mit einem Krypton-Argon-Laser FT488/543 erzeugt. Das emittierte Licht wurde mit einem Breitbandfilter BP510-525 nm detektiert, welcher spezifisch die GFP-abhängige Fluoreszenz durchläßt. Um die Rotfluoreszenz des Vakuolen-Farbstoffs FM4-64 zu zeigen, wurde ebenfalls bei 488 nm

angeregt, das emittierte Licht diesmal aber durch einen BP575-640 nm Filter geleitet. Mit Hilfe eines UV-Lasers wurde bei 364 nm der Farbstoff DAPI angeregt und seine Fluoreszenz mit Hilfe eines BP450-490 nm Filter analysiert. Alle Einzelbilder (512x512 Pixel) wurden mit Hilfe von „line-averaging“ 8-fach gesammelt, jedes für 1 sec.. Alle Bilder wurden als TIFF-Dateien exportiert und mittels Adobe Photoshop 2.5 und Designer 7.0, für den Ausdruck auf einem Tektronix Phaser II SDX Drucker, bearbeitet.

2.28.2 Kultivierung der Hefezellen für das CLSM und spezifische Färbung verschiedener Hefeorganellen

Für die Untersuchungen am CLSM wurden die verschiedenen Hefestämme in YNB-Medium mit 2 % Glukose bis zu einer $OD_{600} = 0,6-1$ kultiviert und anschließend in YNB-Medium mit 2 % Galaktose, zur Induktion, umgesetzt und für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Anschließend wurden sie durch Zentrifugation bei 320xg vom Medium getrennt und zum Mikroskopieren eingesetzt.

Zellkerne sind mit 4,6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) nach der, von Shaw *et al.* (1997) beschriebenen Methode, gefärbt worden. Die Vakuolenmembran wurde mit FM-64 (Molecular Probes/USA) entsprechend der, von Vida und Emr (1995) veröffentlichten Prozedur, gefärbt. Die zur Färbung eingesetzten Zellen wurden bei 320xg zentrifugiert und für 30 min bei 30°C mit den unterschiedlichen Farbstoffen inkubiert. Danach wurde wieder zentrifugiert, 2 mal mit frischem YNB-Medium gewaschen und für weitere 30 min bei 30°C inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 320xg wurden die Zellen in frisches Medium resuspendiert und für die Mikroskopie verwendet.

2.29 Charakterisierung isolierter Zellwände suspensionskultivierter Zellen

2.29.1 Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes

Die Bestimmung des Gesamtkohlenhydratgehaltes beruht auf einer modifizierten Methode nach Dubois *et al.* (1956). Es wurden 200 µl der zu untersuchenden Lösung mit 100 µl 5%igem Phenol gemischt und anschließend mit 500 µl konzentrierter Schwefelsäure versetzt und wieder gemischt. Nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde noch einmal gemischt und nach weiteren 10 min bei 490 nm gegen A. dest. gemessen. Die Kalibrierungsgerade wurde mit Glukose als Standard

erstellt. 3 Versuchsansätze und je 3 Parallelen pro Wert wurden für die Ermittlung des Gesamtkohlenhydratgehaltes herangezogen.

2.29.2 Bestimmung des Zellulose-Gehaltes

Die Bestimmung des Zellulose-Gehaltes beruht auf der Methode nach Updegraff (1969).

Reagenz A: 80 % Essigsäure und konz. Schwefelsäure im Verhältnis 10+1

Reagenz B: 1 mg/ml Anthron in 75%iger Schwefelsäure

Es wurden 200 µl Probe mit 3 ml Reagenz A und 3 Glaskugeln für 30 min gekocht und anschließend 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet noch zweimal mit je 1 ml A. dest. gewaschen. Das nun resultierende Pellet wurde in 2 ml Reagenz B resuspendiert und für 16 min gekocht und abschließend im Eisbad gekühlt. Die Extinktion wurde bei 620 nm gegen A. dest. gemessen. Für die Erstellung der Kalibriergeraden wurde α -Zellulose als Standard verwendet. 3 Versuchsansätze und je 3 Parallelen pro Wert sind für die Ermittlung des Zellulose-Gehaltes herangezogen worden.

2.29.3 Bestimmung von Uronsäuren

Die Hydroxybiphenylmethode zur Bestimmung von Uronsäuren basiert auf einer Methode von Blumenkrantz und Asboe-Hansen (1973).

Reagenz A: 12,5 mM Natriumtetraborat (Sigma/USA) in konz. Schwefelsäure

Reagenz B: 0,15 % m-Hydroxybiphenyl in 0,5 % Natronlauge

Zur Bestimmung der Uronsäuren wurden 300 µl Proben im Eisbad gekühlt, nach Zugabe von 1,8 ml Reagenz A gemischt und dann für 5 min gekocht. Nach Abkühlung im Eisbad wurden 20 µl 0,5 % Natronlauge hinzugegeben und gemischt. Es folgte die Messung der Extinktion bei 520 nm gegen A. dest.. Anschließend wurden 20 µl Reagenz B hinzugefügt, gemischt und frühestens nach 5 min die Extinktion noch einmal bei 520 nm vermessen. Die Differenz der beiden Werte wurde dann zur Auswertung mittels einer Kalibriergeraden, die mit Galakturonsäure als Standard hergestellt wurde, genutzt. Je 3 Parallelen von je 3 Versuchswiederholungen wurden pro Wert ermittelt.

2.29.4 Bestimmung des DNA-Gehaltes

Die Bestimmung des DNA-Gehaltes beruht auf einer modifizierten Methode von Dische (1987).

Reagenz A: 10 % Perchlorsäure (w/v)

Reagenz B: 300 mg Diphenylamin in 20 ml Eisessig lösen

+ 0,3 ml konz. Schwefelsäure

+ 0,1 ml 50%iges wäßriges Acetaldehyd

Zur Bestimmung des DNA-Gehaltes wurden 1 g Zellen (Frischgewicht) mit 1 ml Reagenz A gemischt und 15 min bei 70°C inkubiert. Die Proben wurden dann zu je 0,5 ml aufgeteilt und nach Zugabe von 1 ml Reagenz B über Nacht bei 28°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5 min bei 14.000 U/min) wurde die Extinktion bei 600 nm gegen A. dest. bestimmt und die DNA-Gehalte aus einer Kalibriergeraden, mit Desoxyribose als Standard, ermittelt. Es wurden je 6 Parallelen pro Wert bestimmt und die Versuche 3 mal wiederholt.

2.29.5 Bestimmung der Porengröße von Zellwänden

Für die Bestimmung der Porengröße von Zellwänden suspensionskultivierter Zellen wurde die Methode von Woehlecke und Ehwald (1995) genutzt. Dazu wurden die Zellen durch Filtration über eine Glasfritte vom Medium getrennt, mit einem Vol. A. dest. gewaschen und anschließend mit angesäuertem Ethanol (1 % Essigsäure in 80 % Ethanol) plasmolysiert. Danach wurde Ethanol entfernt und die plasmolysierten Zellen mit 3 Vol. 1 mmol/l CaCl_2 gewaschen. Im Anschluß daran wurden die Zellen in dem Puffer (10 mmol/l Na(P)-Puffer, pH 7,0/0,1 mol/l NaCl/0,1 % NaN_3) aufgenommen, der auch für die Chromatographie genutzt wurde. Es folgte eine Inkubation mit einem Dextrangemisch (Dextran 4, 8 und 15/Serva/Deutschland) über Nacht bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen vom Puffer getrennt und der Überstand durch Größen-Ausschluß-Chromatographie über eine Superdex-HR 75 Säule (PHARMACIA/Schweden) aufgetrennt. Die Bestimmung der Porengröße wurde dann in Auswertung des Chromatogramms, mittels Computerprogramm Excel 5.0 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen im pflanzlichen System

Suspensionskultivierte Tabakzellen sind geeignete Kulturen für die Analyse des Proteinexports bei der Pflanze. Sie sind einfach handhabbar und die von den Zellen exportierten Proteine sind relativ leicht zugänglich. Vorangegangene Untersuchungen hatten gezeigt, daß die normalerweise vakuolär lokalisierten Proteine, CHN der Klasse I und GLN der Klasse I, ins Medium suspensionskultivierter Tabakzellen exportiert werden können (Kunze *et al.*, 1998a). Der Export dieser und weiterer unbekannter Proteine erfolgt auch dann, wenn die klassische Sekretionsroute durch den Inhibitor BFA blockiert wurde. Um Zugang zu den noch unbekannten Proteinen zu finden und deren Gene zu isolieren, sind Antikörper gegen die Gesamtheit dieser, in Gegenwart von BFA exportierten, Proteine hergestellt worden (Kunze *et al.*, 1995), die zum Screening von pflanzlichen Expressionsbanken eingesetzt werden konnten, um die entsprechenden codierenden cDNA's isolieren zu können.

3.1.1 Datenbank-Screening und Klonierung von **CBP20**

3.1.1.1 Isolation der **CBP20** codierenden cDNA

Zwei cDNA-Banken wurden für das Screening mit dem oben genannten Antikörper genutzt. Zum einen eine cDNA-Bank (1) aus Tabakblättern (*N. tabacum* L. cv. Havana SR-1) im Lambda ZAP[®] II Vektorsystem (Stratagene, USA) und eine zweite Tabak cDNA-Bank (2), hergestellt aus polyadenylierter RNA aus der Kultur S-2/LS-2 nach 5tägiger Subkultivierung. Hierzu wurde der ZAP-cDNA-Synthese-Kit der Firma Stratagene (USA) genutzt. Die Fragmente wurden in den ZAP Express[™]-Vektor kloniert, der *Eco*RI restringiert und dephosphoryliert war (Stratagene, USA). Positive Plaques wurden einem 2. und 3. Screening unterzogen, bis schließlich das integrierte pBSC Plasmid aus dem Lambda ZAP[®] II Vektorsystem (1) bzw. das Plasmid pBK-CMV aus dem ZAP Express[™]-System (2) nach Herstellervorschrift isoliert wurde. Bei der anschließenden Sequenzierung der 4 gescreenten cDNA-Klone ergaben sich unterschiedlich lange Fragmente, welche beim Sequenzvergleich Homologien zum Klon *cbp20-44*, isoliert von Ponstein *et al.* (1994), aufwiesen.

3.1.1.2 Vervollständigung des *CBP20*-codierenden cDNA-Fragmentes

Das größte, von uns isolierte, cDNA-Fragment war identisch zum Klon *cbp20-44* von Ponstein *et al.* (1994), lediglich die ersten 18 Nukleotide im 5'-Bereich fehlten. Zur Komplettierung der cDNA wurden 2 PCR-Reaktionen durchgeführt. Die dazu verwendeten Primer sind im Abschnitt 2.2 aufgeführt. In der ersten PCR-Reaktion wurde die cDNA an ihrem 5'-Ende vervollständigt. Am 3'-Ende wurden die Restriktionsorte *Bgl*II und *Nco*I angefügt. In der zweiten PCR-Reaktion sind am 5'-Ende die Restriktionsorte *Nco*I, *Bam*HI und *Hind*III ergänzt worden.

Die in Abb. 3-1 blau dargestellte Nukleinsäuresequenz und die abgeleitete Aminosäuresequenz entspricht der Sequenz des gescreenten Clons *CBP20/1*, nach Vervollständigung durch PCR. Die codierende Region ist mit der von Ponstein *et al.* (1994) publizierten Sequenz identisch.

3.1.1.3 Isolation des *CBP20*-Gens

Zur Isolation des entsprechenden genomischen Clons von *CBP20* wurde eine PCR durchgeführt, bei der chromosomale DNA aus Blättern von *in vitro* Pflanzen als „Template“ und die unter Abschnitt 2.2 aufgeführten Primer eingesetzt wurden. Als Ergebnis erhielten wir ein 1686 bp großes Fragment. Nach Sequenzanalyse stellte sich heraus, daß der genomische Clon *gCBP20* zwischen den Basen 420 und 1452 ein Intron enthält. Die Nukleinsäuresequenz des Introns ist in Abb. 3-1 schwarz dargestellt. Die für Introns typischen Anfangs- und Endbasenkombinationen sind schwarz unterstrichen.

G K L S T L L L V L I L Y F I A A G A N A Q Q C G R
 GGAAAGCTAAGTACTCTTTTGCTTGTCTGATCCTCTATTTTCATAGCCGAGGTGCCAACGCACAGCAGTGC^{CGGAAG}
Q R G G A L C S G N L C C S Q F G W C G S T P E Y C
 GCAAAGGGGAGGAGCCTTATGCAGTGGAACTTGTGCTGCAGCCAATTTGGGTGGTGTGGGTCTACACCGGAATACT
S P S Q G C Q S Q C S G G G G G G G G G G G G A
 GTTCTCCTAGCCAAGGCTGCCAAAGCCAGTGCAGTGGCGGCGGAGGCGGCGGTGGAGGTGGCGGTGGTGGTGGTGC^G
Q N V R A T Y H I Y N P Q N V G W D L Y A V S A Y C
 CAAAACGTTAGGGCAACATATCATATATATAACCCGCAGAATGTTGGGTGGGATTTGTATGCAGTTAGTGCCTACTG
S T W D G N K P L A W R R K Y G W T A F C G P V G P
 CTCAACTTGGGATGGTAACAAGCCTTTGGCATGGCGGAGGAAGTATGGTTGGACTGCATTCTGTGGCCCTGTTGGAC
R G R D S C G K C L R
 CTCGTGGCCGAGACTCTTGTGGCAAATGCTTAAGGGTAAGATTTGGAAATTTAATCTACTTTTGATGATCATATTAG
 TTTAATTTGTTTTTTTTTATAAAGTAGTTTCGTGAGATATTAAATCAATCACCATATCAGCTAGTAACATATAATATA
 CGAATATTAAGTCATAATTTAATTTGAGTTAAGGTTACATAAACATACCGTTTAATTCATTGATTCACTGGTAGCG
 ATTCGGCTATCCACTATTTACGCTCTAAGAAATTGCCTTAAATTCAGTAATGAAATAATCATCCGATAGAACTACAA
 AAATCTGCATTTAGCATCTCTTCTCCTCCTTTGAATTTCAAATTTCTCAATTTATTTAACGACGATCTCTTGTCTTA
 GATTTCAAAAATTTAATGTACCTTGATACTTCTATTAAAGTCTTACTCGTATAAATTTAACACAGAAAAATTTATTT
 CAACTATTCAATTTTGTGCATTTTAAAGTAGTGAATTTTGTGAAGTTCTTTTTTAATTCATGTCTCTAGCCCTAATTA
 ATTATTTGAAAATATTTCAATTGGATAATTATTTTGAAAATTTAGAATAATAACGCTAAATTTATAGCTAGTTAAATG
 TTCCAAATTTTGTATAAAAAATAAAATAAATGAATCCTATATATAAGAAGGCAACATTTGAAAAGAAAAATATCCG
 TACTTACGTTCTACGTGGTGAGGTGCGTGAGATTTATAGAGAGATGTACATACGTAGATCTTAGACTCTTCTTTCAG
 ATCTTTGACTTTTATATCCATTATTATTGGCCAAGTTGGTAGTGTGGGTATTGACTTTTACAACCTAAACTATTCAT
 GAAGAAGCGTAATTATATCCGAAATCACCTTTAATTAGTAACTCTAAGGCTTGTTTTGTGTAACTTCATGTATTT
 TGAATAATCGTGGTCTCAATTTAACTTGATGGCCAAATAGATTTATTTTAAACAACCTAAAACTAAGCATGAGGTAT
 V T N T
 AGTATTTTATTTGTTCTTAAACAGTCTATAACTGCACTATAATAATATCATCACAAAATTGTACAGGTGACAAATAC
G T G A Q T T V R I V D Q C S N G G L D L D V N V F
 AGGCACAGGAGCTCAGACCACAGTGAAGTCAATGCAGCAATGGCGGACTAGACTTGGACGTTAATGTTT
R Q L D T D G R G N Q R G H L I V N Y E F V N C G
 TCCGGCAGCTCGACACAGACGGAAGAGGAATCAACGCGGCCATCTTATTGTGAACCTACGAGTTTGTTAATTGTGGT
D N M N V L L S P V D K E
 GACAATATGAATGTTCTGCTATCCCCAGTTGACAAAGAA

Abb. 3-1: Nukleinsäuresequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des genomischen Clons *gCBP20*. Die blau dargestellte Nukleinsäuresequenz entspricht der CBP20 codierenden cDNA, nach ihrer Komplettierung durch PCR und ist identisch zu der von Ponstein *et al.* (1994) publizierten Sequenz *cpb20-44*. Die abgeleitete Aminosäuresequenz ist rot dargestellt, wobei N- und C-terminus des *CBP20*-Gens rot unterstrichen sind. Das Intron ist schwarz dargestellt, die für Introns typische Anfangs- und Endsequenz ist schwarz unterstrichen.

3.1.2 Lokalisierung des Proteins CBP20 in *in vitro*-Pflanzen, Gewächshauspflanzen und Suspensionskulturen des Tabak

3.1.2.1 Nachweis von CBP20 in Blatt, Sproß und Wurzel von *in vitro* Pflanzen und Zellen von Suspensionskulturen

Es sollte geklärt werden, wo das Protein CBP20 in Tabaksuspensionskulturen akkumuliert wird, und ob es auch in Pflanzen anzutreffen ist. Dazu wurden Zellen einer 6 d alten Suspensionskultur S-2/LS-3 vom Medium getrennt und die Proteine aus den Zellen extrahiert. Weiterhin wurde eine 6 Wochen alte *N. tabacum* SNN-Pflanze in Sproß, Blatt und Wurzel zerlegt, und die einzelnen Bestandteile mit 1xTNT-Puffer extrahiert und für Westernblotexperimente zur Identifizierung von CBP20 eingesetzt. CBP20 konnte nur in Zellen der Suspensionskultur und in den Wurzeln, nicht aber in Blatt und Sproß der *in vitro*-Pflanze nachgewiesen werden (Abb. 3-2). Die Größe des Proteins entspricht in der Suspensionskultur und den Wurzeln 19 kDa. Gleiche Ergebnisse wurden mit Gewächshauspflanzen erzielt.

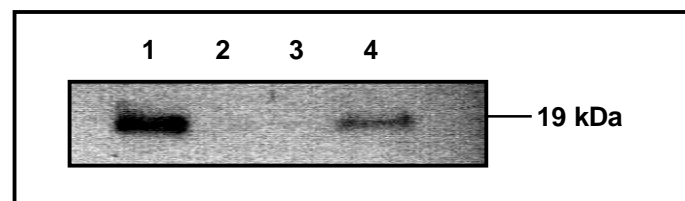


Abb. 3-2: Westernblot zur Lokalisierung von CBP20 in *in vitro*-Pflanzen und Zellen von Suspensionskulturen. Es wurden 5 µg Protein aus Extrakten der Kultur S-2/LS-3 (1), sowie von Blättern (2), des Sprosses (3) und der Wurzel (4) für den Nachweis genutzt.

3.1.2.2 Einfluß des Blattalters auf die CBP20 Akkumulation

Um zu klären, ob das Blattalter einen Einfluß auf die Akkumulation von CBP20 hat, wurden Blätter von 12-14 Wochen alten Gewächshauspflanzen (Höhe 0,8 m; ca. 26 Blätter) entlang der Sproßachse geerntet. Die Numerierung der Blätter erfolgte von der Wurzel beginnend zur Sproßspitze. Ein relativ junges „sink“-Blatt von oben (20.-22. Blatt), aus der Mitte (12.-14. Blatt) und ein „source“-Blatt von unten (3.-4. Blatt), daß phänotypisch keine Seneszenz zeigte, sind extrahiert und für den Westernblot eingesetzt worden, wobei bei gleichen Frischgewichten auch gleiche Volumina Extraktionspuffer verwendet wurden. Dabei stellten wir fest, daß mit zunehmendem Blattalter, auch die spezifische Proteinkonzentration von CBP20 zunahm (Abb. 3-3 (A)). Dieses Experiment ist auch mit einer 9 Wochen alten *in vitro*-Pflanze durchgeführt worden, wobei auch hier „sink“-Blätter

(Blatt 8-9), Blätter aus der Mitte (Blatt 4-5) und „source“-Blätter (Blatt 1-2) eingesetzt wurden. Auch hier konnten wir nachweisen, daß CBP20 nur in den Extrakten älterer Blätter nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-3 (B)).

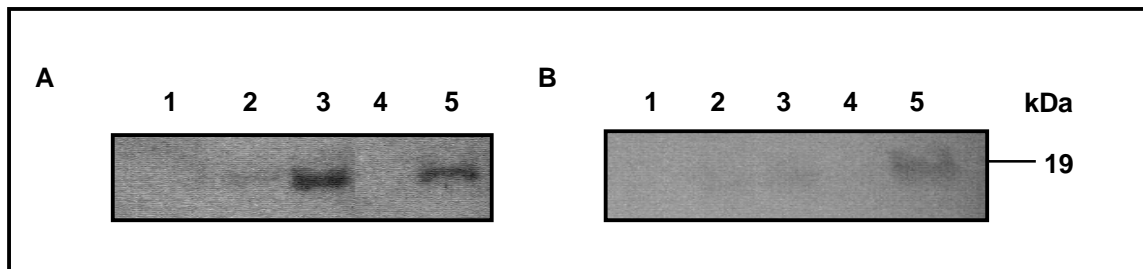
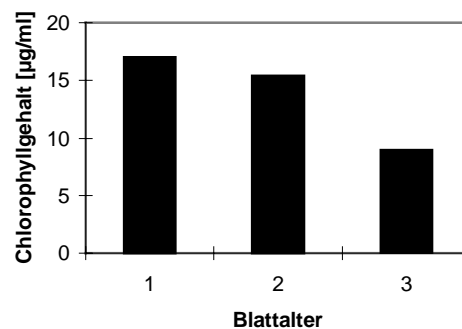


Abb. 3-3: Westernblot für die Lokalisierung von CBP20 in Gewächshaus- (A) und *in vitro*-Pflanzen (B). 5 µg Protein der Extrakte aus jungen „sink“-Blättern (1), Blättern aus dem mittleren Sproßteil (2), älteren „source“-Blättern (3), Sproß (4) und Wurzel (5) wurden verwendet.

Um nun zu überprüfen, ob eventuell Seneszenz der verwendeten „source“-Blätter die Ursache für die Bildung von CBP20 ist, wurde sowohl der Chlorophyllgehalt gemessen als auch die große Untereinheit des chloroplastidären Enzyms Ribulosebisphosphatcarboxylase (Rubisco) im Westernblot nachgewiesen. Dazu wurden Blätter der jeweiligen Entwicklungs- bzw. Altersstadien einer Gewächshauspflanze genutzt.

A



B

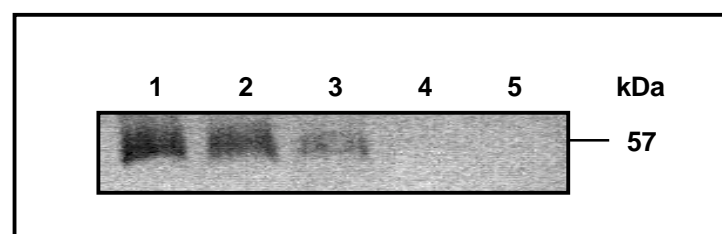


Abb. 3-4: Chlorophyllgehalt (A) und Westernblot mit einem Anti-Rubisco-Antikörper (B) mit Extrakten aus jungen „sink“-Blättern (1), Blättern mittleren Alters (2) und älteren „source“-Blättern (3), Sproß (4) und Wurzel (5).

Aus Abb. 3-4 (A) ist ersichtlich, daß der Chlorophyllgehalt mit dem Blattalter abnimmt. In gleicher Weise nimmt die Intensität der Rubiscopolypeptidbande ab (Abb. 3-4 (B)). In umgekehrter Reihenfolge dazu nimmt der Proteingehalt von CBP20 zu, was die Hypothese unterstützt, daß CBP20 durch Seneszenz induziert wird.

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt wurde, kann CBP20 konstitutiv nur in älteren Blättern und der Wurzel nachgewiesen werden. Nun sollte geklärt werden, ob die CBP20-Proteinkonzentration mit der entsprechenden Transkriptkonzentration korreliert.

Pflanzenmaterial, das dem für die Westernblotexperimente genutzten entsprach, wurde deshalb für Northernexperimente eingesetzt. Im Ergebnis dieser Untersuchung (Abb. 3-5) zeigte sich, daß die höchste Transkriptkonzentration in der Wurzel und dem „source“-Blatt zu finden war. Aber auch in jungen „sink“ Blättern als auch in Blättern des mittleren Sproßabschnittes ist bei der *in vitro*-Pflanze (A), und in jungen Blättern und dem Sproß bei der Gewächshauspflanze (B) CBP20-Transkript nachweisbar.

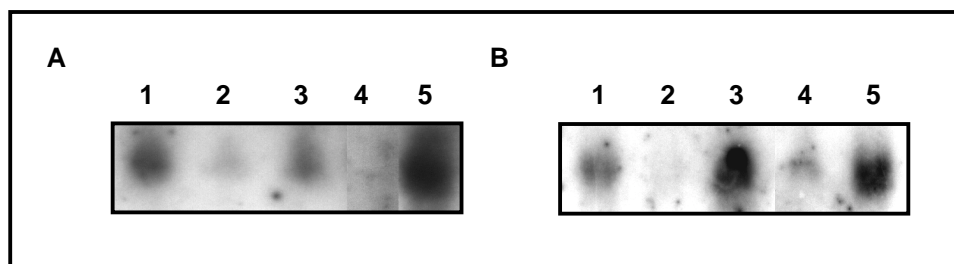


Abb. 3-5: Northernblotanalyse zur Lokalisierung des CBP20-Transkriptes in Extrakten junger Blätter (1), Blättern vom mittleren Sproßbereich (2), alten Blättern (3), Sproß (4) und Wurzel (5) einer *in vitro*-Pflanze (A) und einer Gewächshauspflanze (B). 20 µg Gesamt-RNA wurden aufgetrennt und mit einem ^{32}P -markierten *EcoRI*-Fragment von CBP20-DNA hybridisiert.

3.1.3 Induzierbarkeit der Synthese von CBP20

Das Protein CBP20 ist als basisches „pathogenesis-related“(PR)-Protein beschrieben worden (Ponstein *et al.*, 1994). Basische PR-Proteine werden häufig durch Verwundung und Ethylenbehandlung induziert. Ponstein *et al.* (1994) konnten im Falle der CBP20-Synthese die induzierende Wirkung von Ethylen, Verwundung, UV-Licht und Pathogenbefall durch den Tabak-Mosaik-Virus (TMV) auf Transkriptionsebene nachweisen. Um weiterführende Untersuchungen zur Regulation der Induzierbarkeit des *CBP20*-Gens durchzuführen, sind weitere Streßsituationen getestet worden.

3.1.3.1 Einfluß der Verwundung auf die Akkumulation von CBP20

CBP20 wurde von Ponstein *et al.* (1994) als wundinduzierbares Protein beschrieben, dessen m-RNA-Konzentration 2 d nach Verwundung stark erhöht ist. Um den Einfluß der Verwundung zu testen, wurden Pflanzenteile, wie sie auch für die unter 3.1.2 beschriebenen Experimente eingesetzt worden sind, mit einem Skalpell mehrfach eingeritzt und für 1 h, 4 h und 20 h in einer Petrischale mit Leitungswasser bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden Protein und Gesamt-RNA extrahiert und für Westernblot- und Northernblotexperimente eingesetzt. Auf Transkriptionsebene konnten die Ergebnisse von Ponstein *et al.* (1994) bestätigt werden - 20 h nach der Verwundung wurde eine erhöhte Intensität der CBP20-Bande nachgewiesen (Abb. 3-6).

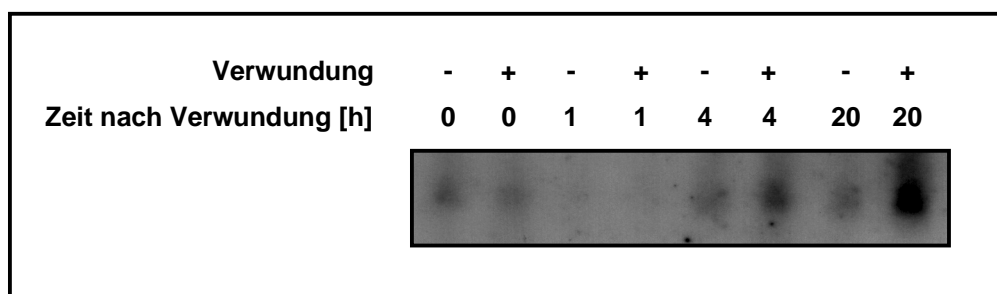


Abb. 3-6: Northernblotexperiment zur Analyse des Einflusses der Verwundung eines *in vitro*-Blattes. Es wurden 20 µg Gesamt-RNA von unverwundeten und verwundeten Blättern aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran „geblottet“. Die Hybridisierung erfolgte mit einem ^{32}P -markierten *EcoRI*-Fragment von CBP20-DNA.

Auf Proteinebene stellte sich heraus, daß bis zu 20 h nach Verwundung keine Erhöhung der Konzentration des CBP20-Proteins in Mesophyllzellen feststellbar ist (Abb. 3-7). Das bedeutet, daß Protein- und Transkriptkonzentration nicht miteinander korrelieren.

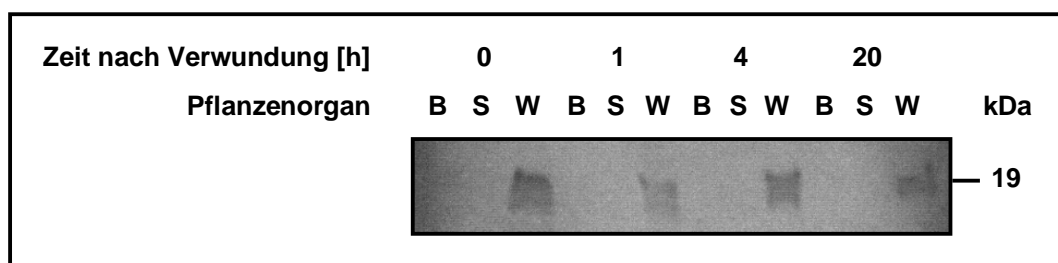


Abb. 3-7: Westernblot zum Nachweis des Einflusses einer 1-, 4- und 20stündigen Verwundung auf die Akkumulation von CBP20. Es wurden 5 µg Protein der Extrakte von unverwundeten und verwundeten Pflanzenorganen eingesetzt (B steht für Blatt, S für Sproß und W für Wurzel).

3.1.3.2 Einfluß von Salicylsäure auf die Akkumulation von CBP20

Salicylsäure (SA) spielt eine Schlüsselrolle in der Signaltransduktion (Hennig *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1991; Yalpani *et al.*, 1991; Vernooij *et al.*, 1994) und kann die Synthese von PR-Proteinen induzieren. Um einen möglichen Einfluß von SA auf die Synthese von CBP20 zu erfassen, wurden 6 Wochen alte *in vitro*-Pflanzen mit 50 mM Natriumsalicylat besprüht und anschließend für 48 h inkubiert. Nach dieser Zeit wurden Blätter entsprechend ihres Alters gesammelt, sowie Sproß und Wurzel für die Proteinextraktion mit anschließendem Westernblot eingesetzt. Im Ergebnis des Westernblots der unbehandelten Kontrollpflanze erhielten wir, wie erwartet, eine CBP20-Polypeptidbande in älteren Blättern und in der Wurzel (Abb. 3-8 (A Bahn 3 und 5)). Bei der Pflanze, die mit SA behandelt wurde, konnten wir auch in jungen und mittelalten Blättern CBP20 nachweisen, was dafür spricht, daß SA die CBP20 Proteinakkumulation induziert (Abb. 3-8 (A Bahn 6 und 7)). Zur Kontrolle wiesen wir in denselben Proteinextrakten einen weiteren Vertreter basischer PR-Proteine, die CHN der Klasse I, nach, deren Akkumulation jedoch durch SA nicht erhöht wurde (Abb. 3-8 (B)).

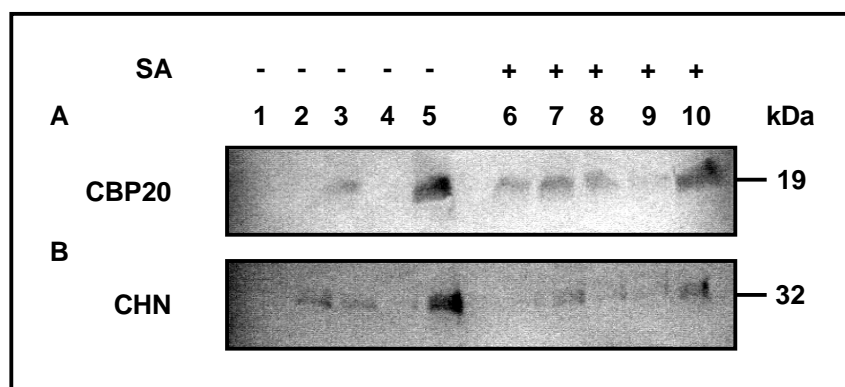


Abb. 3-8: Westernblot für den Nachweis der Akkumulation von CBP20 und CHN durch SA. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtprotein der Extrakte von Blättern vom oberen (1, 6), - mittleren (2, 7) und - unteren Teil der *in vitro*-Pflanze (3, 8), sowie vom Sproß (4, 9) und der Wurzel (5, 10) genutzt. Für dieses Experiment wurde eine unbehandelte Kontrollpflanze und eine mit 50 mM Natriumsalicylat besprühte *in vitro*-Pflanze, die 48 h nach dem Besprühen extrahiert wurde, verwendet.

3.1.3.3 Induzierbarkeit der Synthese von CBP20 durch Schwermetalle

Unphysiologisch hohe Schwermetallkonzentrationen können ebenfalls als Streßfaktor wirken und damit auch PR-Proteine induzieren (Chai *et al.*, 1998). Nachfolgende Experimente sollten klären, ob die Synthese von CBP20 durch die Schwermetalle

Cadmiumsulfat, Cobaltchlorid, Kupfersulfat, Silbernitrat und Zinkchlorid induziert werden kann.

3.1.3.3.1 Einfluß von Schwermetallen auf die Protein- und Transkriptkonzentration von CBP20 in Tabaksuspensionskulturen

Als Erstes sollte der Einfluß von Schwermetallen auf die CBP20 Akkumulation in Tabaksuspensionskulturen analysiert werden. Hierzu wurde die Linie 425 in dem Medium LS-3 6 d vorkultiviert, anschließend filtriert, gewaschen und je 2g Zellen in 20 ml LS-3-Medium ohne und mit je 100 μ M Silbernitrat, Cadmiumsulfat, Cobaltchlorid, Kupfersulfat bzw. Zinkchlorid überführt. Nach Inkubation über Nacht bei 24°C wurden die Zellen mit 1xTNT-Puffer extrahiert und für Westernblotexperimente mit den Antikörpern Anti-CBP20, Anti-CHN und Anti-TK eingesetzt.

In Extrakten aus Zellen, die mit Zinkchlorid behandelt worden sind, war eine intensivere Bande des CBP20-Proteins nachweisbar als im entsprechenden Kontrollextrakt aus unbehandelten Zellen (Abb. 3-9 (A)). Das gleiche Ergebnis konnte für die CHN der Klasse I erzielt werden (Abb. 3-9 (B)). Der Nachweis der Transketolase – einem plastidären Protein - wurde als Kontrolle mitgeführt, um die Aufladung gleicher Proteinmengen pro Bahn zu beweisen (Abb. 3-9 (C)).

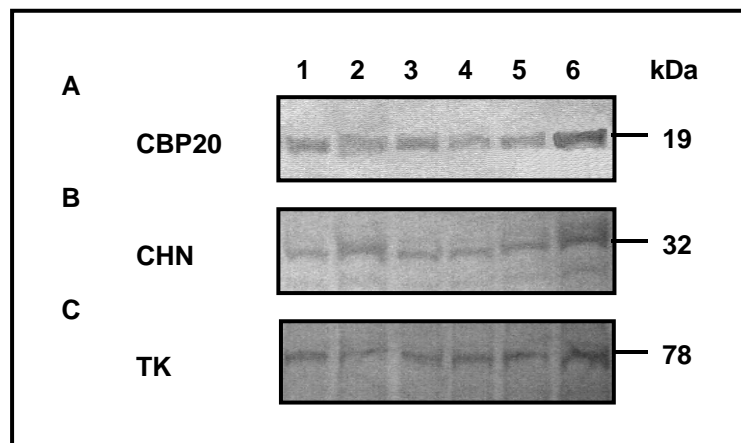


Abb. 3-9: Westernblot für den Nachweis der Induzierbarkeit des *CBP20*-Gens durch Schwermetalle. Zellen der Kultur 425/LS-3 wurden über Nacht ohne Schwermetall (1) und mit je 100 μ M Silbernitrat (2), Cadmiumsulfat (3), Cobaltchlorid (4), Kupfersulfat (5) und Zinkchlorid (6) inkubiert. **A** Inkubation mit Anti-CBP20-Antikörpern, **B** Inkubation mit Anti-CHN-Antikörpern, **C** Inkubation mit Anti-TK-Antikörpern.

Da auf Proteinebene nur Zinkchlorid einen Einfluß zeigte, haben wir uns bei den weiteren Untersuchungen auf dieses Schwermetall beschränkt. Es sollte anschließend untersucht werden, inwieweit sich die Transkriptkonzentration von CBP20 in Gegenwart von Zink-

chlorid im Verlauf der Kultivierung ändert. Dazu wurden 2 g Zellmaterial der Kultur 425/LS-3 nach 6tägiger Vorkultur in 20 ml Medium ohne Schwermetall und mit je 100 µM Zinkchlorid transferiert und für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Nach 0, 1, 2, 3, 4 und 7 d wurde aus den Zellen die Gesamt-RNA extrahiert und für Northernblotexperimente verwendet. Die Northernexperimente zeigten einen konstanten Anstieg der m-RNA-Konzentration von CBP20 nach Zugabe von 100 µM Zinkchlorid bis zum 4. d (Abb. 3-10). Am 7. d fiel die m-RNA-Konzentration dann wieder stark ab und war zu dieser Zeit annähernd gleich zu der m-RNA-Konzentration nach 7 d ohne Zinkchlorid. Die höchste CBP20 m-RNA-Konzentrationserhöhung nach Induktion durch Zinkchlorid wurde nach 2 d registriert. Der Abfall nach 7 d kann darauf hinweisen, daß die eingesetzte Zinkchloridkonzentration zu diesem Zeitpunkt bereits schädigend auf die Zellen wirkt, was zur Reduktion der m-RNA-Konzentration führt.

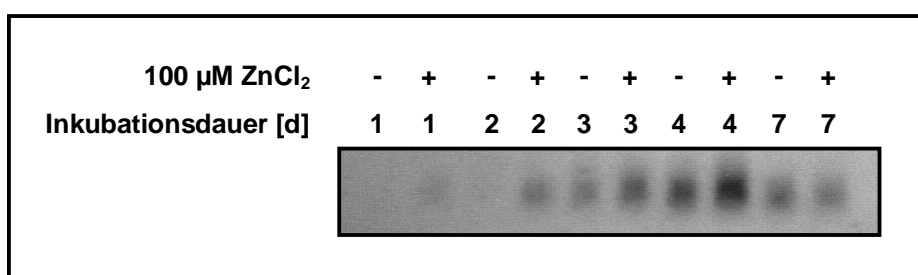


Abb. 3-10: Northernblotanalyse der Kultur 425/LS-3, welche ohne und mit 100 µM Zinkchlorid kultiviert wurde. 20 µg Gesamt-RNA wurden aufgetrennt und mit einem ³²P-markierten *EcoRI*-Fragment von CBP20-DNA bei 42°C hybridisiert.

3.1.3.3.2 Einfluß von Schwermetallen auf die Protein- und Transkriptkonzentration von CBP20 in Blättern von *in vitro*-Pflanzen

Da im Abschnitt 3.1.3.3.1 nachgewiesen werden konnte, daß Zinkchlorid einen Einfluß auf die Akkumulation von CBP20 in Tabaksuspensionskulturen hat, sollte anschließend überprüft werden, ob und wenn ja welche Schwermetalle in Blättern von *in vitro*- und Gewächshauspflanzen induzierend auf die Synthese von CBP20 wirken. Da wir unter 3.1.2.1 zeigen konnten, daß das CBP20-Protein in jungen Blättern nicht nachgewiesen werden kann, schienen sie das geeignete Material für derartige Untersuchungen zu sein. Es wurden Blätter einer *in vitro*-Pflanze mit einem Skalpell verwundet und in einer Petrischale mit je 10 mM Silbernitrat, Cadmiumsulfat, Cobaltchlorid, Kupfersulfat, Zinkchlorid und eine Kontrolle ohne Schwermetall bei Raumtemperatur und leichtem Rotieren über Nacht inkubiert. TNT-Extrakte dieser Proben wurden für Westernblotexperimente mit den Antikörpern Anti-CBP20 und Anti-CHN genutzt.

Ebenso wie in Suspensionskulturen wirkt Zinkchlorid in Blättern von *in vitro*-Pflanzen induzierend auf die Synthese von CBP20. Zusätzlich zu diesem Schwermetall erhöhen Cadmiumsulfat und Kupfersulfat die CBP20-Proteinkonzentration in Blättern von *in vitro*-Pflanzen (Abb. 3-11 (A)). Silbernitrat und Cobaltchlorid haben scheinbar keinen Einfluß. Auch bei der CHN der Klasse I konnte eine induzierende Wirkung von Cadmiumsulfat und Kupfersulfat beobachtet werden (Abb. 3-11 (B)).

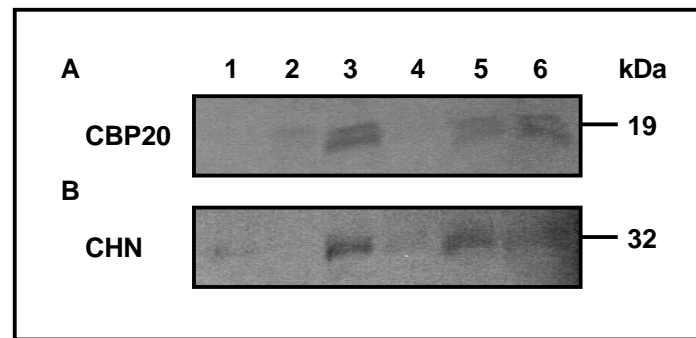


Abb. 3-11: Westernblotexperiment für den Nachweis der Induzierbarkeit der Synthese der Proteine CBP20 (A) und CHN (B) durch Schwermetalle in Blättern einer *in vitro*-Pflanze. Es wurden 5 µg Gesamtprotein der Proben nach Inkubation über Nacht ohne Schwermetall (1) und mit je 10 mM Silbernitrat (2), Cadmiumsulfat (3), Cobaltchlorid (4), Kupfersulfat (5) und Zinkchlorid (6) verwendet.

Danach wurde geprüft, ob die Erhöhung der Proteinkonzentration eine Folge der Erhöhung der Transkriptkonzentration war. Dazu wurden wieder Blätter einer *in vitro*-Pflanze verwundet und über Nacht in 1 mM der verschiedenen Schwermetalle inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und diese für Northernblotexperimente eingesetzt. Wie in Abb. 3-12 zu sehen ist, können wir auch bei der Transkriptkonzentration eine Erhöhung durch Cadmiumsulfat und Zinkchlorid beobachten. Bei Kupfersulfat ließ sich keine Gesamt-RNA isolieren, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, daß dieses Schwermetall toxisch auf die Zellen wirkt. Für dieses Schwermetall müßte eine kürzere Inkubationszeit oder eine geringere Konzentration gewählt werden.

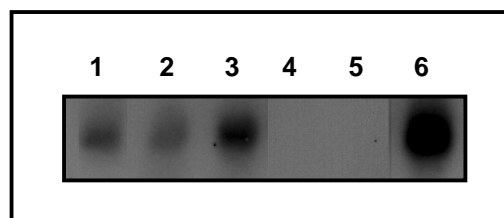


Abb. 3-12: Northernblotexperiment zum Nachweis der Transkriptkonzentration von CBP20 nach Inkubation mit verschiedenen Schwermetallen. Es wurden 20 µg Gesamt-RNA von Blättern, die ohne Schwermetall (1), und mit je 1 mM Silbernitrat (2), Cadmiumsulfat (3), Cobaltchlorid (4), Kupfersulfat (5) bzw. Zinkchlorid (6) behandelt worden sind, aufgetrennt und mit einem ^{32}P -markierten *EcoRI*-Fragment von CBP20-DNA hybridisiert.

3.1.3.3 Einfluß von Zinkchlorid auf die Protein- und Transkriptkonzentration von CBP20 in Blättern von *in vitro*- und Gewächshauspflanzen

Blätter einer *in vitro*-Pflanze wurden mit einem Skalpell verwundet und über Nacht mit verschiedenen Zinkchloridkonzentrationen (Kontrolle ohne Schwermetall; 100 μ M; 1 mM; 10 mM; 100 mM) inkubiert. Anschließend wurden Proteinextrakte hergestellt und diese für Westernblotexperimente eingesetzt.

Ebenso wurde mit einem jungen Blatt einer Gewächshauspflanze verfahren, wobei hier die Zinkchloridkonzentrationen 0 mM; 100 mM; 500 mM und 1 M betragen.

In *in vitro*-Blättern konnten wir CBP20 bereits nach Inkubation mit 100 μ M Zinkchlorid nachweisen (Abb. 3-13 (A)). In Extrakten der mit 10 mM und 100 mM behandelten Proben war die CBP20-Bande intensiver als bei den mit 100 μ M und 1 mM Zinkchlorid inkubierten. Im Vergleich dazu ist beim Blatt der Gewächshauspflanze (Abb. 3-13 (B)) eine Erhöhung bei 100 mM Zinkchlorid festzustellen, die höheren Konzentrationen führen zu keiner weiteren Erhöhung der Expression von CBP20.

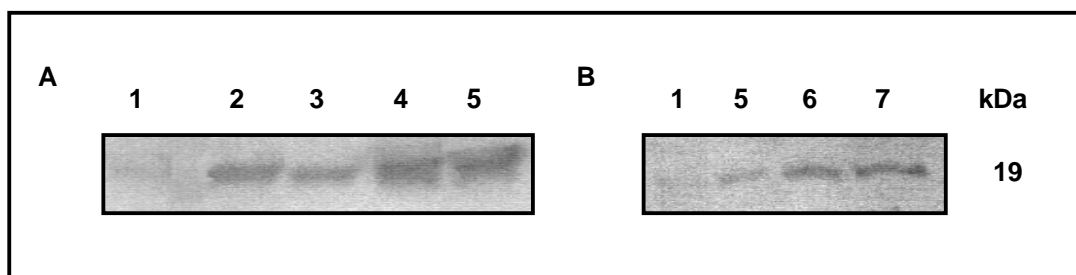


Abb. 3-13: Einfluß von verschiedenen Zinkchloridkonzentrationen auf die Expressionshöhe von CBP20 in Blättern einer *in vitro*-Pflanze (A) und einer Gewächshauspflanze (B). Es wurden 5 μ g Gesamtproteinextrakt von Blättern, die mit 0 mM (1), 100 μ M (2), 1 mM (3), 10 mM (4), 100 mM (5), 500 mM (6) und 1 M (7) Zinkchlorid behandelt worden sind, für Westernblotexperimente unter Verwendung des Anti-CBP20-Antikörpers eingesetzt.

In Auswertung des Northernblotexperiments (Abb. 3-14) konnten wir feststellen, daß in Blättern, die mit 100 μ M Zinkchlorid behandelt worden waren, zwar eine intensivere CBP20-Transkriptbande im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nachweisbar war, doch bei höheren Konzentrationen war kein Transkript mehr zu finden. Dies ist möglicherweise auf die schädigende Wirkung der relativ hohen Schwermetallkonzentration für einen zu langen Zeitraum verursacht worden.

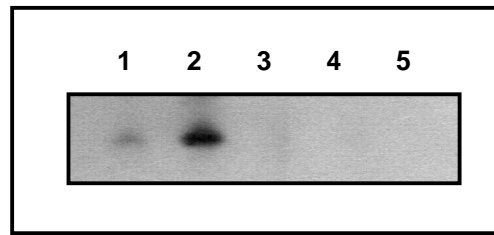


Abb. 3-14: Northernblot zum Nachweis der Induktion der CBP20-Transkriptkonzentration durch verschiedene Zinkchloridkonzentrationen. Es wurden 20 µg Gesamt-RNA von Blättern, die mit 0 mM (1), 100 µM (2), 1 mM (3), 10 mM (4), 100 mM (5) Zinkchlorid über Nacht behandelt worden sind, aufgetrennt. Als Sonde diente ein ^{32}P -markiertes *EcoRI*-Fragment von CBP20-DNA.

Werden Blätter für 30 min mit 1 mM Zinkchlorid (Abb. 3-15 (A)) behandelt, so konnte im entsprechenden Extrakt ein starkes CBP20-Signal (Abb. 3-15 (A), Bahn 2) nachgewiesen werden. Mit zunehmender Inkubationszeit liefern die Blattextrakte dann zunächst eine abnehmende Intensität des Signales (nach 4 h, Abb. 3-15 (A), Bahn 3), die dann jedoch nach 12 h Inkubation wieder zunahm (Abb. 3-15 (A), Bahn 4). Möglicherweise war die Zunahme der CBP20-m-RNA-Konzentration nach 0,5 h nicht auf Zinkchlorid, sondern auf die Streßsituation der Aufarbeitung zurückzuführen, während die erhöhte Signalintensität nach 12 h durch das Schwermetall verursacht worden war. In Blattproben, die mit 100 mM Zinkchlorid (Abb. 3-15 (B)) inkubiert worden waren, war eine konstante Erhöhung der CBP20-Transkriptkonzentration von 0,5 h bis 4 h nachweisbar, nach 12 h fiel die Konzentration allerdings wieder ab, was vermutlich auf die Schwermetall-bedingte Zellschädigung zurückzuführen war.

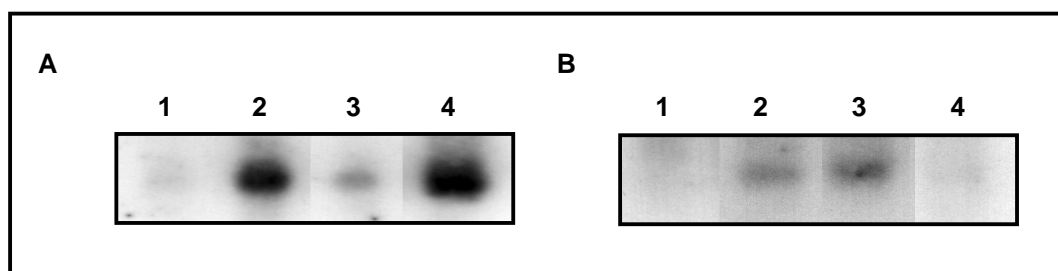


Abb. 3-15: Nachweis der CBP20-Transkriptmenge in Blattproben, die mit 1 mM (A) und 100 mM (B) Zinkchlorid für 0 h (1), 0,5 h (2), 4 h (3) und 12 h (4) behandelt worden sind. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt und mit einem ^{32}P -markierten *EcoRI*-Fragment von CBP20-DNA hybridisiert.

3.1.3.3.4 Einfluß von Zinkchlorid auf die Halbwertszeit der CBP20-Transkriptkonzentration

Nach den unter 3.1.3.3.1 und 3.1.3.3.3 gezeigten Ergebnissen stellte sich die Frage, ob die Erhöhung der CBP20-Transkriptkonzentration in Gegenwart von Zinkchlorid durch eine erhöhte Transkriptionsaktivität des *CBP20*-Gens oder eine verringerte Stabilität des CBP20-Transkriptes unter den getesteten Bedingungen hervorgerufen wurde. Um dies unterscheiden zu können, wurden ein „source“-Blatt einer Gewächshauspflanze, bei dem eine konstitutive Transkriptkonzentration zu erwarten war und ein *in vitro* Blatt nach 15stündiger Induktion mit 1 mM Zinkchlorid untersucht. Dazu wurden die Blätter in einer Petrischale mit A. dest. + 100 mg/ml Actinomycin D, das die m-RNA-Synthese blockiert (Kapros *et al.*, 1995), 1 min infiltriert und dann 2 bzw. 4 h auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle dienten Proben, die ohne Actinomycin D behandelt worden sind. Aus den so behandelten Blättern wurde die Gesamt-RNA isoliert und für Northernblotexperimente eingesetzt. Bei dem „source“-Blatt lag die Halbwertszeit des CBP20-Transkriptes bei ca. 2 h (Abb. 3-16 (A)). Im Gegensatz dazu konnten wir bei dem durch Zinkchlorid induzierten CBP20-Transkript eine Halbwertszeit von weniger als 2 h ermitteln (Abb. 3-16 (B)). Das heißt, daß die durch Zinkchlorid induzierte CBP20-Transkriptkonzentrationserhöhung vermutlich eine Folge einer erhöhten Transkriptionsaktivität und nicht durch eine Erhöhung der Transkriptstabilität verursacht worden ist.

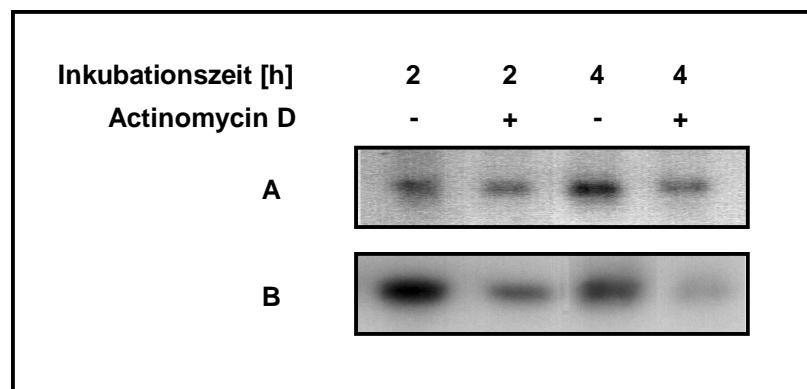


Abb. 3-16: Northernblot zur Einschätzung der von Zinkchlorid beeinflussten Stabilität der CBP20-Transkriptkonzentration. Es wurden ein „source“-Blatt einer Gewächshauspflanze (A) und ein *in vitro* Blatt nach 15 h Inkubation mit 1 mM Zinkchlorid (B) je 2 und 4 h ohne (1, 3) und mit (2, 4) 100 mg/ml Actinomycin D behandelt. Je 20 µg Gesamt-RNA wurden eingesetzt und mit einem ³²P-markierten *Eco*RI-Fragment von CBP20-DNA hybridisiert.

3.1.4 Untersuchungen zur Regulation des *CBP20*-Gens

3.1.4.1 Isolation des Promotors von *CBP20*

Da wir bei den Untersuchungen zu den Einflüssen von Verwundung, Seneszenz und Schwermetallen Unterschiede zwischen Transkript- und Proteinkonzentration feststellen konnten, sollte, für weitere Analysen der Regulation des *CBP20*-Gens, der Promotor von *CBP20* isoliert werden. Hierfür wurde eine PCR mit genomischer DNA und 2 Primern durchgeführt. Die Sequenz von Primer 1 war eine in Promotoren von PR-Proteinen hoch konservierte Sequenz und die von Primer 2 war dem Anfang des *CBP20*-Gens homolog. Die genaue Durchführung ist unter Abschnitt 2.23 beschrieben. Im Ergebnis der PCR erhielten wir 3 unterschiedlich große Fragmente, die nach Sequenzanalyse Identität zum *CBP20*-Gen am 3'-Ende der Promotorsequenzen aufwiesen (Abb. 3-17). Die Promotorsequenzen *CBP20/2* und *CBP20/3* waren bis auf den Anfangsbereich fast identisch und haben eine Homologie zum Clon *cbp20-44*, wohingegen Promotorsequenz *CBP20/1* eine Homologie zum Clon *cbp20-52* aufwies. Unterschiede bestehen auch in der Länge der Sequenzen. So ist die Sequenz *CBP20/1* 676 bp, *CBP20/2* 427 bp und *CBP20/3* 408 bp lang.

```

CBP20/1 CTTATGAAGCTAAAAGCCGCC-----ATCAGTCCTACTTCTGTATACGTCT
          *****
CBP20/2 CTTATGAAGCTAAAAGCCGCCTCTACTATAAAAGCCGCCATCAGTCCTGCT---GTATACGTCT
          *****
CBP20/3 CTTATGAAGCTAAAAGCCGCC-----ATCAGTCCTGCT---GTATACGTCT

CBP20/1 CCTAAATCCTCACC GTTGAATTCTATCCCTACGACATAAAATTTGTGACATTGACGTAATACTT
          ***                * * * * *
CBP20/2 TCTATCCC-----CACGGACATAAATTAGTGACACTGACGTAACACACTTATACTT
          *****
CBP20/3 TCTATCCC-----CACGG-CATAAATTAGTGACACTGACGTAACACACTAATACTT

CBP20/1 AAAAGTTGAAAATATTTCTAAACTAATGAGTATGTAA--TTAATTAATTGAAAAAACATATAT
          *****
CBP20/2 AAAAGTTGAAAATACTTCTAAATTAATGAGTATGTAACTATTTTAATTTATAAAATATATTTAC
          *****
CBP20/3 AAAAGTTGAAAATACTTCTAAATTAATGAGTATGTAACTATTTTAATTTATAAAATATATTTAC

CBP20/1 GGTACACTTCTATCCTTTGAAAATATTAATTTGTAAAATGTTAATATCTAATCAAACATCATC
          *****
CBP20/2 GGTACACTTTTATCCTTTGAAGATATTAATTCGTAAAATTTTAGTAACATAGTAATAATTAAG
          *****
CBP20/3 GGTACACTTTTATCCTTTGAAGATATTAATTCGTAAAATTTTAGTAACATAGTAATAATTAAG

CBP20/1 ATATATGATAAATAAAGTAGT--AATTATGGTTTAATATATACAGTCAGATCTCTCTATAACAA
          * * * * *
CBP20/2 TACTCCTATGATTTAACATCTCGAATTACCAACTCAAGTTTTCAAGGTGTTTTTTAGTTATTCA
          *****
CBP20/3 TACTCCCATGATTTAACATCTCGAATTACCAACTCAAGTTTTCAAGGTGTTTTTTAGTTATTCA

CBP20/1 TATCTTTATATAATAACACTTTATTATAATAGCCAAATTTTTTCGGAATCGATTTTCATATTTT
          GTTATAATATATGTTCTTTATAATAGCACTTCGTTATAACATCCAAAAATATTCGGACAAATGA
          GGCTGTTATAAATATTATAGAGAGGTTTGCATGCATTCCGAATTTCCAACCTCAAAGGGTTTTTTT
          TTAATTAGTCTAAGCAGCATAACATGGGGAGCACCCAAAATTCACGCACACACGCAAAAT

CBP20/1 GTAGTTTTTTCAAATGTTATGTCCCAAACCAAAATAAATACACTAATTAAACAGATAAAACAAAA
          **** *
CBP20/2 CGTAATTTTTCAACTCTTATGTCAAGCCAAAAAATATATACTAATTAAACAGCTTAATAAAAA
          *****
CBP20/3 CGTAATTTTTCAACACTTATGTCAAGCCAAAAAATATATACTAATTAAACAGCTAAATAAAAA

CBP20/1 AGAAAACCTTATAAAAACCCACAACCTGGATCAGACAACACCAGTTCAAACACTTTGAAAATGGG
          *****
CBP20/2 AGAAAACCTTATAAAAATCCACAAATGGATCAGACAACACCAGTTCAAACACTTTGAAAATGGG
          *****
CBP20/3 AGAAAACCTTATAAAAATCCACAAATGGATCAGACAACACCAGTTCAAACACTTTGAAAATGGG

CBP20/1 AAAGCTAAGTACACTTTTAT
          *****
CBP20/2 AAAGCTAAGTACACTTTTGC
          *****
CBP20/3 AAAGCTAAGTACACTTTTGC

```

Abb. 3-17: Sequenzvergleich der nach der PCR erhaltenen potentiellen *CBP20*-Promotorsequenzen.

3.1.4.2 Untersuchungen zur Aktivität der Promotorsequenzen

Die im vorherigen Abschnitt beschriebenen Promotorsequenzen sollten nun bezüglich ihrer Aktivität untersucht werden. Dazu wurden alle 3 Sequenzen in den β -Glukuronidase (GUS) enthaltenden binären Vektor pGPTV kloniert und anschließend in den Agrobakterienstamm EHA105pEHA105 transformiert. Dieser wurde dazu genutzt, um den Gentransfer in Tabakpflanzen, wie unter Abschnitt 2.18.4 beschrieben, vorzunehmen. Die Auswertung der Pflanzentransformation ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 3-1: Auswertung der Pflanzentransformation mit Promotor-GUS-Konstrukten von CBP20.

Konstrukt	Anzahl der Co-kultivierten Explantate	Anzahl der Pflanzen mit Phosphinothricinresistenz	Anzahl der Pflanzen mit GUS-Aktivität in der Wurzel
<i>CBP20/1</i>	ca. 200	37	4
<i>CBP20/2</i>	ca. 200	52	25
<i>CBP20/3</i>	ca. 200	46	11

Die erhaltenen Phosphinothricin-resistenten Tabaklinien sollten daraufhin auf ihre GUS-Aktivität untersucht werden. Es wurden zuerst die Wurzeln der transgenen Pflanzen für den Nachweis verwendet, da CBP20 konstitutiv in den Wurzeln von Tabakpflanzen akkumuliert wird und daher der entsprechende Promotor dort aktiv sein sollte. Die Durchführung des GUS-Tests ist unter Abschnitt 2.20.3 beschrieben.

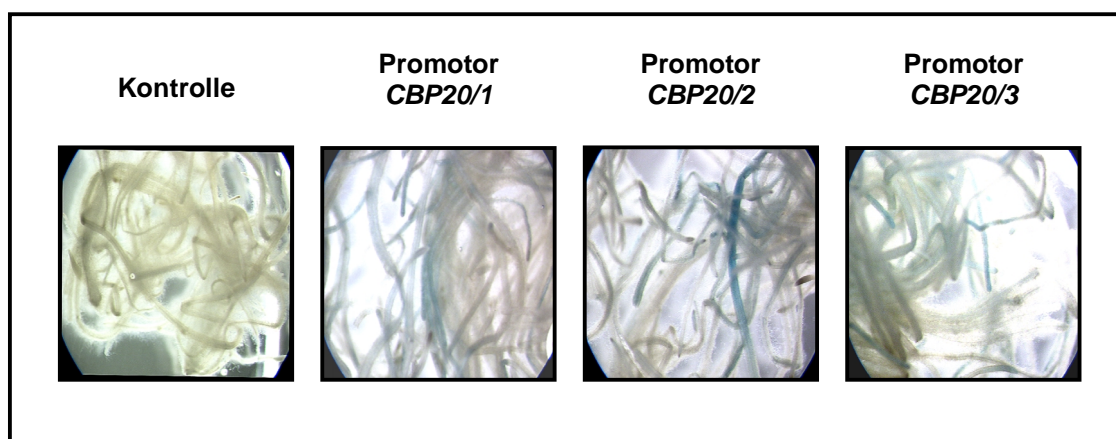


Abb. 3-18: GUS-Aktivität in Wurzeln ausgewählter transgener Tabakpflanzen mit Promotor-GUS-Konstrukten.

Die Transformation aller 3 Konstrukte führte zu transgenen Pflanzen, deren Wurzeln die β -Glukuronidase exprimieren (Abb. 3-18). Allerdings waren nicht alle Wurzeln und diese nicht immer vollständig gefärbt. Es konnte auch eine unterschiedlich starke β -Glukuronidase-Expression zwischen den verschiedenen Konstrukten beobachtet werden. Konstrukt CBP20/2 zeigte die stärkste und Konstrukt CBP20/3 die schwächste Expression.

Ein weiterer Beweis dafür, daß es sich bei den 3 Sequenzen um potentielle Promotorfragmente der *CBP20*-Genfamilie handelt, sollte durch den Nachweis von GUS-Aktivität in Blättern nach Schwermetallinduktion erbracht werden. Hierfür wurden Blätter der transgenen Linien über Nacht in 0,1; 1 und 10 mM ZnCl_2 inkubiert und anschließend der GUS-Nachweis durchgeführt. Dabei konnte keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Es wäre möglich, daß entweder das Schwermetall die Nachweisreaktion oder die Expression von GUS beeinflusst hat oder das die Promotorsequenzen nicht vollständig waren und somit der Teil, der durch Schwermetallinduktion aktiviert würde, nicht in den Sequenzen enthalten war.

3.1.4.3 Untersuchungen zum Einfluß von „sense“- und „antisense“-Konstrukten von *CBP20* in transgenen Tabakpflanzen

Um den Einfluß von Überexpression und Repression von *CBP20* in transgenen Tabakpflanzen zu untersuchen, wurden „sense“- und „antisense“-Pflanzen von *CBP20* hergestellt (siehe 2.24 und Abb. 3-19). Dazu wurde *CBP20* in beiden Orientierungen in den binären Vektor pBinAR, unter der Kontrolle des CaMV 35S-Promotors, kloniert.

Die Anzahl der verwendeten Explantate, der erhaltenen transgenen Pflanzen und der Pflanzen mit veränderter *CBP20*-Expression ist in der nachfolgenden Tabelle dargestellt.

Tab. 3-2: Auswertung der Tabaktransformation mit *CBP20*-„sense“- und –„antisense“-Konstrukten.

Konstrukt	Anzahl der Co-kultivierten Explantate	Anzahl der Pflanzen mit Kanamycinresistenz	Anzahl der Pflanzen mit veränderter <i>CBP20</i> -Expression
„sense“	ca. 200	78	18
„antisense“	ca. 200	44	32

Die erhaltenen transgenen Linien zeigten im Vergleich zum Wildtyp keine Veränderungen im Phänotyp.

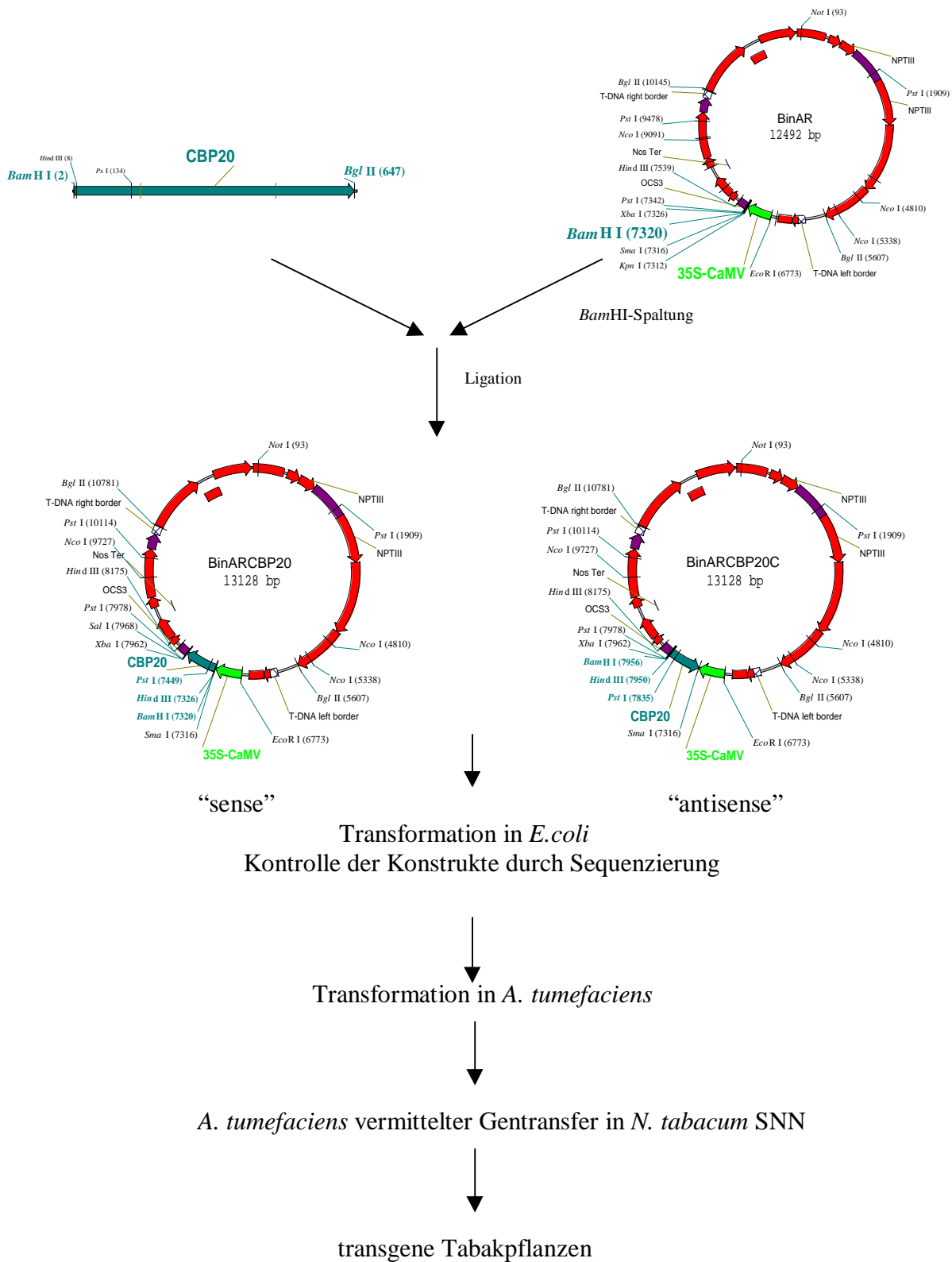


Abb. 3-19: Klonierung von *CBP20* in „sense“- und „antisense“-Orientierung in den Vektor pBinAR und Transformation in Tabak

Um nun den Einfluß der beiden Konstrukte auf die Expression von CBP20 zu überprüfen, wurden aus Blättern und Wurzeln von Wildtyp-, „sense“- und „antisense“-Pflanzen Proteinextrakte hergestellt und für Westernblotexperimente eingesetzt. In „sink“-Blättern von Wildtyp und „antisense“-Pflanzen konnte wie erwartet kein CBP20-Protein nachgewiesen werden (Abb. 3-20). In Blättern von „sense“-Pflanzen kann eine CBP20-Bande mit starker Intensität nachgewiesen werden, was auf eine konstitutive Expression hinweist. Bei der Untersuchung der Wurzeln konnten wir in Wildtyp- und „sense“-Pflanzen CBP20 nachweisen. Demgegenüber war dies bei „antisense“-Pflanzen nicht möglich. Hier scheint die Bildung von CBP20 stark reduziert zu werden.

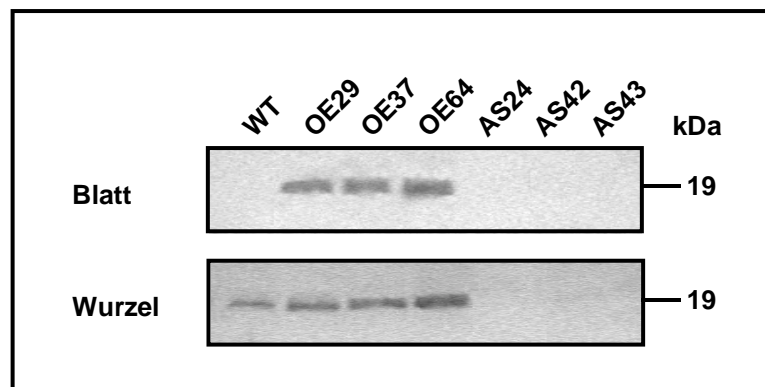


Abb. 3-20: Nachweis von CBP20 in Blättern und Wurzeln von Wildtyp- (WT), „sense“- (OE) und „antisense“- Pflanzen (AS). Es wurden 3 µg Protein aufgetrennt und für den Nachweis mit Anti-CBP20-Antikörpern genutzt.

3.1.5 Nachweis von CBP20 in Zellen und Medium von Tabaksuspensionskulturen

3.1.5.1 Akkumulation des CBP20-Proteins im Medium in Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium

Um die Akkumulation von CBP20 innerhalb und außerhalb suspensionskultivierter Zellen im Verlaufe der Kultivierung zu untersuchen, wurde die Zellsuspensionskultur S-2 (Kunze *et al.* 1998a) im Medium nach Linsmaier und Skoog (1965) mit unterschiedlichen Wachstumsregulatoren kultiviert. Das Medium **LS-2** enthielt 0,5 mg/l des Auxins 2,4D, 3 mg/l des Auxins IAA und 0,04 mg/l des Zytokinins KIN. Medium **LS-3** wich in der Zusammensetzung der Wachstumsregulatoren ab. Es enthielt 2 mg/l des Auxins NAA und 0,3 mg/l KIN.

Im Medium LS-2 kultivierte Zellen sind nachfolgend als S-2/LS-2 Kulturen und LS-3 inkubierte Zellen als S-2/LS-3 Kulturen bezeichnet worden. S-2/LS-2 und S-2/LS-3 wurden, wie unter 2.19 beschrieben, in 2 g Portionen in jeweils 10 ml des jeweiligen Mediums für 0 h, 4 h, 1, 2, 3, 4 und 6 d kultiviert. Nach den entsprechenden Inkubationszeiten sind die Zellen vom Medium getrennt worden. Die Extraktion der Zellen erfolgte in TNT-Puffer, während die Medien 10fach konzentriert worden sind, um für Westernblotexperimente genutzt zu werden. In Abb. 3-21 (A) ist das Ergebnis für die Kultur S-2/LS-2 und in (B) das für die Kultur S-2/LS-3 dargestellt.

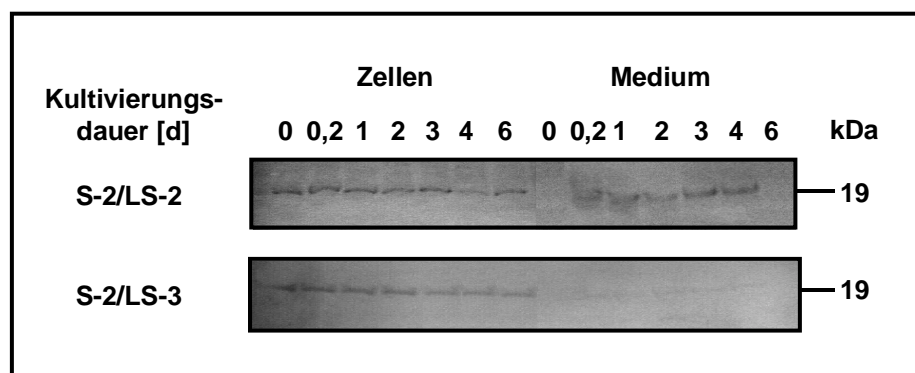


Abb. 3-21: Westernblotanalyse zum Nachweis von CBP20 in Zellen und Medium der Zelllinie S-2. 1 µg Protein von Zellen und Aliquote der 10fach konzentrierten Medien wurden nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten für den Nachweis genutzt.

Wie aus der Abb. 3-21 ersichtlich ist, ist CBP20 während der gesamten Kultivierungsdauer in den Extrakten der Zellen aus beiden Kultivierungsmedien nachweisbar. Im Gegensatz zu den im Medium LS-3 inkubierten Zellen war es in den im Medium LS-2 inkubierten Zellen auch im Medium zu finden.

Kunze *et al.* (1998a) hatten früher schon gezeigt, daß die vakuolär lokalisierten Enzyme Chitinase und α -Mannosidase in das Medium LS-2 aber nicht in das Medium LS-3 sekretiert werden. Es wurde vermutet, daß das Auxin 2,4D allein oder im Zusammenhang mit anderen Wachstumsregulatoren für diesen Effekt verantwortlich ist. Um zu testen, ob Analoges auch für CBP20 gilt, wurden Zellen in dem 2,4D-freien Medium LS-3, dem 2 mg/l 2,4D zugesetzt worden sind, für 3 d inkubiert. Nach 0 h, 4 h, 1, 2 und 3 d wurden die Proben, wie oben bereits beschrieben, aufgearbeitet. Bei der Westernblotanalyse, deren Ergebnis in Abb. 3-22 dargestellt ist, stellte sich heraus, daß bereits nach 4 h doch spätestens nach 1 d CBP20 im Kulturmedium nachweisbar war. Dieses Ergebnis zeigte, daß 2,4D die Akkumulation von CBP20 ins Kulturmedium bewirkt oder zumindest fördert.

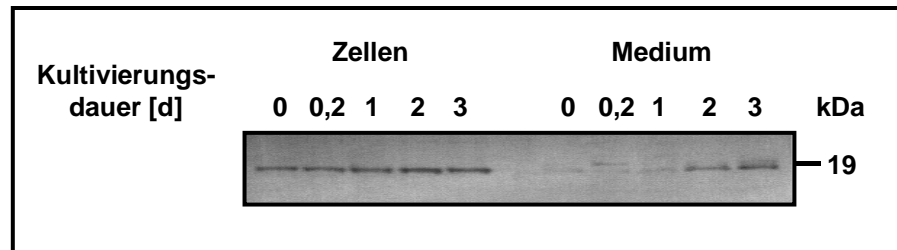


Abb. 3-22: Westernblotanalyse zum Nachweis von CBP20 in Zellen und Medium der Kultur S-2/LS-3 nach Zugabe von 2 mg/l 2,4D. 1 µg Protein der Zellextrakte und Aliquote der 10fach konzentrierten Medien wurden nach unterschiedlichen Kultivierungszeiten für den Nachweis genutzt.

Um auszuschließen, daß bei unseren Versuchen innerzellulär lokalisierte Proteine durch Zellbruch ins Medium gelangt sein könnten, haben wir die Malatdehydrogenase (MDH) als ein innerzellulär lokalisiertes Enzym gemessen. Die Malatdehydrogenase ist in den Mitochondrien und dem Zytoplasma lokalisiert (Thom *et al.*, 1982; Kaiser *et al.*, 1982) und sensitiv nachweisbar, so daß sie als Marker für eventuellen Zellbruch geeignet war. Im Medium LS-3 wurden MDH-Aktivitäten von weniger als 3 % und im Medium von LS-2 weniger als 1,5 %, bezogen auf die Gesamtaktivität, nachgewiesen. Dieses Ergebnis macht die Akkumulation von CBP20 im Medium von LS-2 kultivierten Zellen allein durch Zellbruch unwahrscheinlich.

3.1.5.2 Untersuchungen zum Einfluß von 2,4D auf die Transkriptkonzentration von CBP20 in suspensionskultivierten Tabakzellen

Der Export eines vakuolären Proteins könnte durch seine Überexpression und die damit verbundene Überlastung der vakuolären Sortierung verursacht werden. Deshalb sollte der Einfluß des Auxins 2,4D auf die CBP20-m-RNA-Konzentration mittels Northernblotanalyse untersucht werden. Hierzu wurden Zellen der Kultur S-2/LS-3 nach unterschiedlichen Zeiten durch Filtrieren vom Medium getrennt. Die Zellen wurden in flüssigem Stickstoff durch Mörsern aufgeschlossen. Nach Zugabe von 500 µl RNA-Extraktionspuffer wurden die Proben, wie unter 2.11.1 beschrieben, extrahiert und je 20 µg Gesamt-RNA sind gelelektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine NC-Membran „geblottet“ worden. Wie in Abb. 3-23 zu sehen ist, stieg die CBP20-m-RNA-Konzentration nach 4 h bzw. 1 d steil an und fiel danach wieder stark ab, um anschließend bis zum 6. d annähernd gleich zu bleiben.

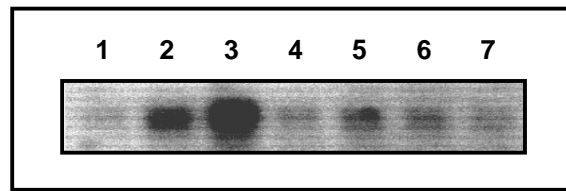


Abb. 3-23: Northernblotanalyse von Zellen der Kultur S-2/LS-3, welche 0 h (1), 4 h (2), 1 d (3), 2 d (4), 3 d (5), 4 d (6) und 6 d (7) mit 2 mg/l 2,4D kultiviert wurde. 20 µg Gesamt-RNA wurden aufgetrennt und mit einem ^{32}P -markierten *EcoRI*-Fragment von CBP20-DNA hybridisiert.

Für die Erhöhung der m-RNA-Konzentration kann entweder das Auxin 2,4D oder die Bedingungen beim Start der Kultur, wie Waschen, Fraktionieren und Anpassung an das neue Medium verantwortlich sein. Um dies zu klären, wurden Zellen der S-2/LS-3 Kultur in frisches LS-3 Medium überführt und für 3 d vorkultiviert. Während dieser Zeit ist die Adaptierung der Zellen an das neue Medium zu erwarten, und die m-RNA-Konzentration war, wie in Abb. 3-23 ersichtlich, zu diesem Zeitpunkt sehr gering. Nun wurde 2,4D bis zu einer Endkonzentration von 2 mg/l zugegeben und die Kulturen für 4 h, 8 h, 1 d und 2 d inkubiert. Anschließend wurde wieder die m-RNA isoliert und für Northernblotexperimente eingesetzt. In Abb. 3-24 ist zu sehen, daß nach Zugabe von 2,4D die m-RNA-Konzentration anstieg, was beweist, daß nicht nur die Bedingungen beim Start der Kultur für die m-RNA-Erhöhung verantwortlich sind, sondern auch das Auxin 2,4D. Es ist also nicht auszuschließen, daß 2,4D eine erhöhte Expression von CBP20 bewirkt. Ob die extrazelluläre Akkumulation durch die erhöhte CBP20-Expression und somit eine Überlastung des vakuolären Transportes zustande kommt, konnte nicht eindeutig geklärt werden, muß aber auch in Betracht gezogen werden.

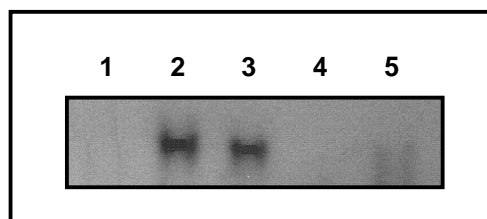


Abb. 3-24: Northernblotexperiment zur Analyse des Einflusses von 2,4D auf die m-RNA-Konzentration von CBP20. Zellen der Kultur S-2/LS-3 wurden für 3 d in 2,4D-freiem Medium vorkultiviert. Nach Zugabe von 2 mg/l 2,4D wurden die Zellen für 0 h (1), 4 h (2), 8 h (3), 1 d (4) und 2 d (5) weiter kultiviert. Es wurden jeweils 20 µg Gesamt-RNA pro Bahn getrennt und mit einem ^{32}P -markierten *EcoRI*-Fragment von CBP20-DNA hybridisiert.

3.1.5.3 Untersuchungen zur Reifung von CBP20

Vakuoläre Proteine besitzen in der Regel ein Propeptid, das für den Transport des Proteins zur Vakuole verantwortlich ist. Diese Propeptide werden in einem Reifungsprozeß proteolytisch entfernt, wonach das reife Protein entsteht, so wurde es zumindest für das Klasse I Enzym GLN, welches zur Gruppe 2 der PR-Proteine gehört, beschrieben (Sticher *et al.*, 1992). „Pulse-Chase“-Experimente zeigten, daß nach frühen „Chase“-Zeiten zwei Polypeptide mit den Molekularmassen von 39 und 33 kDa präzipitiert werden konnten. Das größere der beiden Polypeptide repräsentiert vermutlich das Proenzym. Die Molekularmassendifferenz zwischen dem Proprotein und dem reifen Protein beträgt 6 kDa und erklärt sich aus der Größe des Propeptides von 21 Aminosäuren und einer N-Glykosylierung in dieser Region. Das kleinere Polypeptid mit einer Molekularmasse von 33 kDa repräsentiert das reife Enzym. Die C-terminale Prozessierung ist nach 3 h beendet. Sticher *et al.* (1992) beschrieben weiterhin, daß die Reifung des Proenzym vermutlich sehr spät auf dem Weg zur Vakuole oder erst in der Vakuole selbst stattfindet.

Um posttranslationale Modifizierungen des neu gebildeten CBP20 Proteins zu erfassen, wurden ebenfalls „Pulse-Chase“-Experimente durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit ^{35}S -markiertem Methionin/Cystein für 1 h inkubiert und nach 0 h, 1 h, 3 h, 6 h und 20 h untersucht. Die Zellen wurden, wie unter 2.17 beschrieben, extrahiert und mit Antikörpern gegen CBP20 bzw. GLN immunoabsorbiert. Beide Antikörper immunoabsorbierten jeweils zwei Proteine (Abb. 3-25), die vermutlich die Pro- und reife Form der Proteine repräsentieren. Bei CBP20 war das größere Polypeptid ungefähr 21 kDa groß. Nach einem 3stündigen „Chase“ wurde die Intensität der Banden für das Proprotein schwächer und sowohl im Falle der GLN als auch CBP20 wurde jeweils eine zweite Bande von 33 bzw. 19 kDa sichtbar. Die theoretische Größe von CBP20 nach C-terminaler Prozessierung müßte nach den Angaben von Ponstein *et al.* (1994) zwischen 19 und 20 kDa liegen. Dieses Experiment zeigt, daß CBP20 ebenso wie die GLN innerhalb von 3 h prozessiert wird.

Das in unseren Westernblots nachgewiesene CBP20-Polypeptid in Zellextrakten und im Kulturmedium entspricht auf Grund seiner Größe von 19 kDa vermutlich der reifen Form des Proteins.

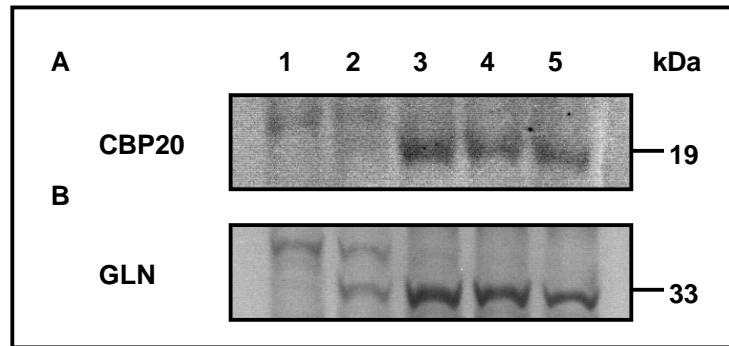


Abb. 3-25: „Pulse-Chase“-Experiment mit der Linie S-2. Die Zellen wurden 1h mit ^{35}S markierten Aminosäuren inkubiert und nach 0 h (1), 1 h (2), 3 h (3), 6 h (4) und 20 h (5) extrahiert und mit Anti-CBP20-Antikörpern (A) und Anti-GLN-Antikörpern (B) immunoabsorbiert.

3.1.5.4 Nachweis von CBP20 in der Zellwand

Bei der Herstellung von Zellextrakten wurden auch zellwandständige Proteine erfaßt. Diese Proteine haben jedoch die cytoplasmatische Membran passiert und sind demzufolge keine innerzellulären, sondern exportierte Proteine. Um eine potentielle Rolle der Zellwand als Lokisationsort für CBP20 - und möglicherweise auch für andere (vakuoläre) Proteine - zu identifizieren, wurden Zellwände aus suspensionskultivierten Zellen der Linie S-2, kultiviert in den Medien LS-2 und LS-3, sowie aus *in vitro* Blättern präpariert und bezüglich des Vorkommens von CBP20, der CHN und eines Kontrollproteins untersucht. Bei der Zellwandpräparation ist der Zellaufschluß der kritischste Schritt. Werden die Zellen nicht vollständig aufgeschlossen, werden sie bei der Aufarbeitung mitgeführt und erst bei der Salzextraktion aufgebrochen, was zur Verunreinigung der Zellwandfraktion mit innerzellulären Proteinen führt. Allerdings dürfen die Zellwandbruchstücke auch nicht zu klein sein, da lose gebundene Proteine während der Aufarbeitung verloren gehen könnten. Die von uns genutzte Methode ist unter Abschnitt 2.6.2 beschrieben. Der effiziente Zellaufschluß wurde mikroskopisch kontrolliert. Die aufgebrochenen Zellen wurden anschließend intensiv gewaschen, um alle innerzellulären Proteine zu entfernen. Von den einzelnen Fraktionen wurden Aliquote in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran „geblottet“ und mit verschiedenen Antikörpern behandelt (Abb. 3-26). In den Zellwandfraktionen der Linie S-2 konnte CBP20 sowohl nach Kultivierung in dem 2,4D-haltigen Medium LS-2, als auch in dem 2,4D-freien Medium LS-3 nachgewiesen werden. In der Zellwandfraktion der *in vitro* Blätter konnte dagegen kein CBP20 gefunden werden (A). Das CBP20-Polypeptid war erwartungsgemäß auch in der Fraktion der löslichen innerzellulären Proteine (0,4M Saccharose) und im Gesamtextrakt vorhanden. In der Zellwandfraktion der Kultur S-2/LS-3 war der Anteil von CBP20 in der Zell-

wandfraktion höher als bei Zellwandpräparationen aus Zellen, die in LS-2 Medium kultiviert worden sind. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, daß in der Kultur S-2/LS-2 CBP20 auch ins Medium exportiert wird, was zur Verringerung des CBP20-Gehaltes in der Zellwand führen könnte.

CHN der Klasse I verhalten sich hinsichtlich ihrer Lokalisierung in den untersuchten Suspensionskulturen ähnlich zu CBP20 (B). Allerdings sah es hier so aus, als wenn in der Kultur S-2/LS-2 die gesamte CHN in der Zellwand lokalisiert war.

Als Kontrolle für die Reinheit unserer Zellwandpräparation ist die Verteilung zweier Markerproteine ermittelt worden. Die Transketolase als plastidär lokalisiertes Enzym wurde im Westernblot mit Hilfe eines Anti-Transketolase-Antikörpers nachgewiesen. Da das Protein nur in der 0,4 M Saccharose-Fraktion und im Gesamtextrakt, aber nicht in der Zellwandfraktion nachgewiesen werden konnte, kann geschlußfolgert werden, daß die Zellwandfraktion nur wenig mit innerzellulären Proteinen verunreinigt war. Weiterhin wurde noch die Aktivität der MDH als weiteres innerzelluläres Enzym bestimmt. In allen Zellwandfraktionen lag der Wert der MDH unter 1 % der Gesamtaktivität der Kulturen, was ebenfalls für eine relativ gute Qualität unserer Zellwandfraktion spricht.

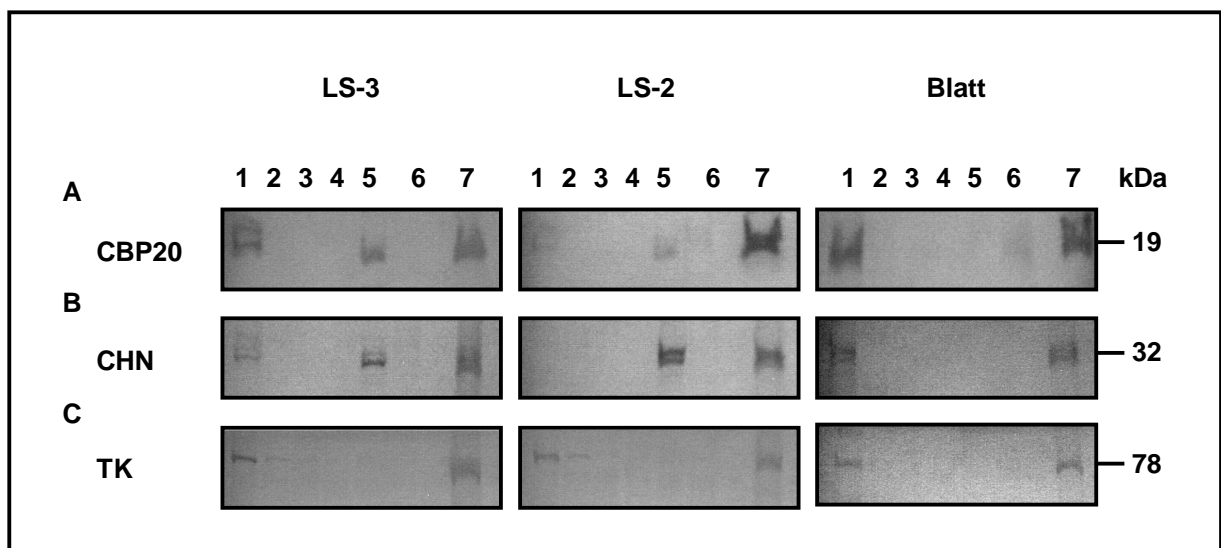


Abb. 3-26: Westernblot zum Nachweis von CBP20 (A), der CHN der Klasse I (B) und der Transketolase (C) in folgenden subzellulären Fraktionen bei der Zellwandpräparation: 0,4 M Saccharosewaschlösung (1), 0,6 M Saccharosewaschlösung (2), 1 M Saccharosewaschlösung (3), Wasser (4), Zellwandfraktion (5), SDS-Extrakt des Rückstandes nach der Salzextraktion des Zellwandmaterials (6) sowie SDS-Gesamtextrakt (7). Aliquote der einzelnen Fraktionen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und parallele Gelblots sind mit den Antikörpern Anti-CBP20, Anti-CHN und Anti-TK behandelt worden.

Es wurde dann geprüft, wie schnell neu synthetisiertes CBP20-Protein zur Zellwand transportiert wird. Hierfür wurden Zellen, die in 2,4D-freiem Medium kultiviert worden sind, mit ^{35}S -markiertem Methionin/Cystein für 12 h inkubiert und anschließend innerhalb von weiteren 12 h protoplastiert. Aus den gereinigten Protoplasten wurden die Proteine extrahiert und das Medium mit den verdauten Zellwänden wurde mit Centricell-Einheiten 10fach konzentriert. Aliquote der beiden Fraktionen wurden für die Immunopräzipitation mit Anti-CBP20, Anti-CHN und Anti-GLN eingesetzt. Im Ergebnis dieser Untersuchung konnten wir feststellen, daß ein großer Anteil der neu gebildeten Proteine die Zellwand bereits erreicht hat (Abb. 3-27). Im Falle der CHN der Klasse I und der GLN der Klasse I war der Anteil in der Zellwand sogar höher als in der Protoplastenfraction. Bei CBP20 schien der Anteil in beiden Fraktionen annähernd gleich zu sein.

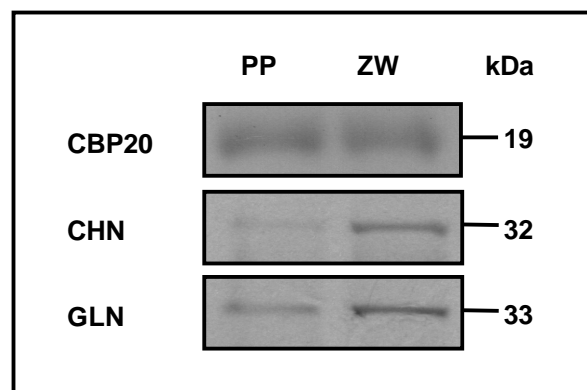


Abb. 3-27: In vivo Markierungsexperiment zum Nachweis von CBP20, CHN und GLN in der Zellwandfraktion der Kultur S-2/LS-3. Die Zellen wurden 12 h mit ^{35}S markierten Methionin/Cystein-Mix inkubiert, für 12 h protoplastiert und anschließend die Protoplasten- (PP) und Zellwandfraktion (ZW) mit Anti-CBP20- (A), Anti-CHN- (B) und Anti-GLN-Antikörpern (C) immunoabsorbiert.

3.1.5.5 Bestimmung der Porosität der Zellwände

Der Nachweis von CBP20 in Zellwänden der Suspensionskulturen S-2/LS-2 und S-2/LS-3 sowie im 2,4D-haltigen Medium der Kultur S-2/LS-2 führte zu der Vermutung, daß 2,4D eine Veränderung der Porengröße der Zellwand bewirken könnte, was den Export der Proteine verursacht. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Porengrößen der Zellen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit und den beiden Kultivierungsmedien LS-2 und LS-3 untersucht. Zusätzlich wurde noch eine Kultur genutzt, zu der nach 2,4D-freier Vor-kultur 2,4D zugegeben wurde. Dazu nutzten wir die, unter Abschnitt 2.29.5 beschriebene, Methode nach Woehlecke und Ehwald (1995). Die Methode beruht auf einer Größenausschluß-Chromatographie mit polydispersen Dextranen, vor und nach Kalibrierung mit den extrahierten Zellbestandteilen. Die Zellwände beider 2,4D-haltigen Medien hatten ab dem 6. d bis zum 10. d eine größere Porengröße als die 2,4D-freie Kultur (Abb. 3-28).

Aus diesen Untersuchungen war auch sehr gut der Einfluß des Auxins 2,4D auf die Porengröße der Zellwände erkennbar. Während die Porengröße der 2,4D-freien Kultur und die der 2,4D-freien Kultur mit zusätzlich appliziertem 2,4D bis zum 2. d gleich blieb, stieg die Porengröße nach 2,4D Zugabe bis zum 4. d auf den Wert von 3,6 nm und somit über den Wert der kontinuierlich mit 2,4D kultivierten Zellen von 3,2 nm. Im Gegensatz dazu lag der Wert der Porengröße der 2,4D-freien Kultur am 4. d ebenfalls bei 3,2 nm. Die kontinuierlich mit 2,4D kultivierten Zellen erreichten ihr Maximum von 3,5 nm am 6. d was dann bis zum Ende des Untersuchungszeitraumes auf eine Porengröße von 3,3 nm abfiel, während in der 2,4D-freien Kultur eine maximale Porengröße von 3,2 nm bereits am 4. d erreicht wurde und dann bis zum 10. d auf einen Wert von 2,7 nm absank.

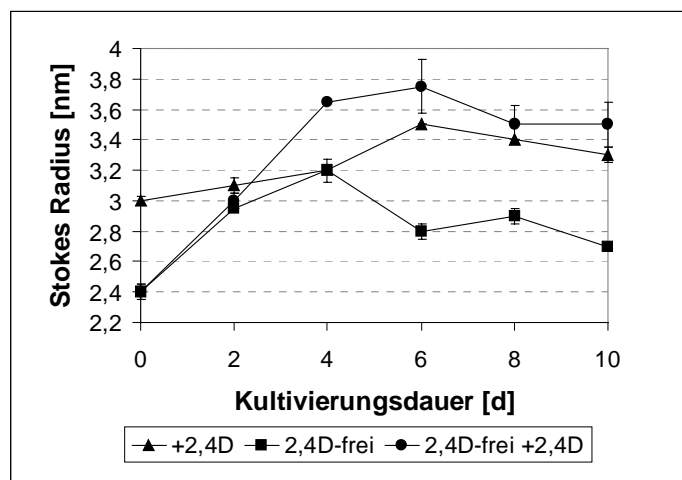


Abb. 3-28: Erfassung der Stoke'schen Radien als Maß für die Porengrößen in Abhängigkeit von der Kultivierungszeit.

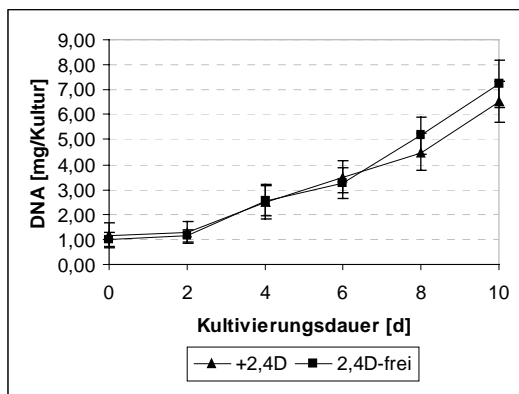
Aus diesen Ergebnissen könnte man schlußfolgern, daß die geringere Porengröße bei der 2,4D-freien Kultur LS-3 die Ursache für den geringeren Export von CBP20 ins Medium war. Da der theoretische Stoke's Radius eines 20 kDa Proteins ca. 2 nm beträgt und der kleinste Stoke's Radius der Zellwände jedoch bei 2,4 nm lag, können unterschiedliche Porengrößen nicht der einzige Grund für die beobachteten Unterschiede bezüglich des Medien-bedingten Exportes sein. Weitere Ursachen für die beobachteten Sekretionsunterschiede könnten Änderungen des Gehaltes an Kohlenhydraten, Zellulose, Galakturonsäure und Proteinen in den Zellwänden sein.

3.1.5.6 Charakterisierung der Zellwände bezüglich ihres Gehaltes an Kohlenhydraten, Zellulose, Galakturonsäure und Proteinen

Zellwände enthalten vor allem Kohlenhydrate, Zellulose und Pektin, deren Anteile sich in Abhängigkeit von Alter, Umweltfaktoren und Entwicklungszustand ändern können (Reviews: Varner and Lin, 1989; Cosgrove, 1997). Da die Zusammensetzung der Zellwände auch ihre Durchlässigkeit bzw. Bindungsstärke für Proteine beeinflussen könnte, wurden Zellwandpräparationen von Zellen, kultiviert in 2,4D-haltigem und 2,4D-freien Medium, hergestellt und bezüglich ihres Gehaltes an Kohlenhydraten, Zellulose, Galakturonsäure und Protein, während der Kultivierungszeit von 0 bis 10 d, untersucht. Die einzelnen Bestimmungsmethoden wurden unter 2.29 beschrieben. Dabei stellte sich das Problem eines geeigneten Bezugspunktes für diese Untersuchungen, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Da sich die Größe und die Morphologie der Zellen der beiden Kulturen (S-2/LS-2 und S-2/LS-3) unterschieden, konnte pro 1 g Frischgewicht keine einheitlichen Zellzahl erwartet werden. Deshalb schien das Frischgewicht (und auch das Trockengewicht) keine geeignete Bezugsgröße zu sein. Aus diesem Grund wurde der DNA-Gehalt als Bezugsgröße gewählt, denn dieser sollte pro Zelle in etwa gleich sein. Außerdem korreliert er mit der Zellzahl. Im Verlaufe der Kultivierung konnte in beiden Kulturen ein kontinuierlicher Anstieg des DNA-Gehaltes ab dem 2. d festgestellt werden (Abb. 3-29 (A)).

Ein weiterer Schwerpunkt unseres Interesses lag auf einem eventuell unterschiedlichen Proteingehalt der Zellwände beider Kulturen. Dieser stieg bei beiden Kulturen bis zum 2. d an und fiel dann wieder ab (Abb. 3-29 (B)), wobei der Proteingehalt der Zellwände der 2,4D-freien Kultur nur 2/3 des Wertes der 2,4D-haltigen Kultur betrug. Bei Zellwänden der 2,4D-haltigen Kultur stieg der Proteingehalt dann vom 4. d bis zum 8. d wieder an, um bis zum 10. d wieder leicht zurückzugehen. Der Proteingehalt der Zellwände der 2,4D-freien Kultur stieg dagegen nur vom 4. bis zum 6. d an, fiel dann bis zum 8. d wieder ab, um dann bis zum 10. d wieder leicht anzusteigen. Unabhängig von den relativ starken Schwankungen der Zellwandproteingehalte beider Kulturen, lag der Proteingehalt in den Zellwänden der mit 2,4D kultivierten Zellen immer höher, als der im 2,4D-freien Medium inkubierten Kultur.

A



B

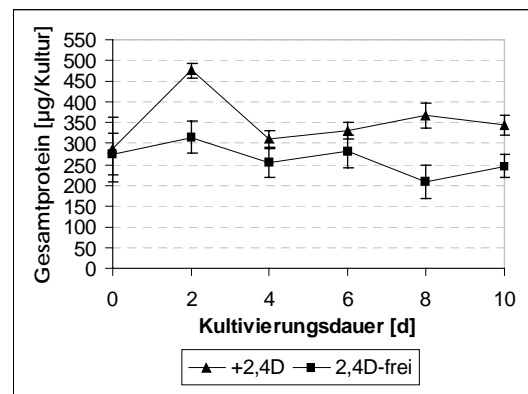
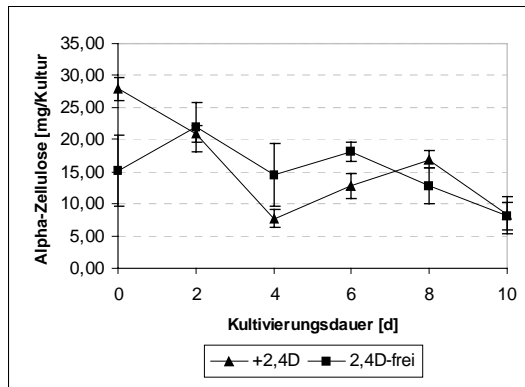


Abb. 3-29: Einfluß der Kultivierungsdauer auf den DNA-Gehalt der Zellen (A) und den Proteingehalt der Zellwände (B) in 2,4D-haltigen und 2,4D-freien Kulturen.

Bei der Bestimmung des Zellulosegehaltes der Zellwände stellte sich heraus, daß zu Beginn der Kultur der Gehalt an Zellulose in den Zellwänden der 2,4D-haltigen Kultur doppelt so hoch war, wie in der 2,4D-freien Kultur. Bis zum 4. d sank der Zellulosegehalt in dieser Kultur dann auf $\frac{1}{4}$ des Anfangswertes und stieg dann bis zum 8. d wieder an. Bis zum 10. d verringerte sich der Wert dann wieder auf die Hälfte (Abb. 3-30 (A)). Im Gegensatz dazu, stieg der Zellulosegehalt in den Zellwänden der 2,4D-freien Kultur bis zum 2. d an, fiel dann bis zum 4. d wieder auf das Anfangsniveau, um nach einem Anstieg bis zum 6. d wieder abzufallen. Hier waren dann die Zellulosegehalte der Zellwände in beiden Kulturen gleich.

Bei der Bestimmung des Zellulosegehaltes im Kulturmedium zeigte es sich, daß bei 2,4D-haltigen Kulturen der Zellulosegehalt im Medium stieg, während er in der Zellwand zur gleichen Zeit abnahm (Abb. 3-30 (B)). Hier wuchs der Zellulosegehalt bis zum 4. d an, nahm dann bis zum 8. d ab, um dann noch einmal leicht anzusteigen. Die Absolutwerte lagen vom 2. bis zum 10. d immer über denen von 2,4D-freien Kulturen. Bei 2,4D-freien Kulturen hatten wir einen etwas anderen Verlauf. Der Zellulosegehalt des Mediums stieg hier bis auf sein Maximum am 4. d und fiel dann wieder bis zum 10. d ab.

A



B

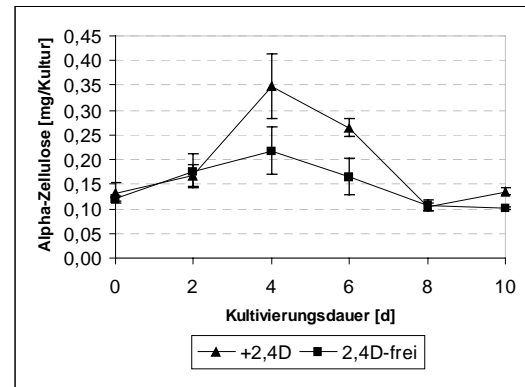


Abb. 3-30: Veränderungen der Zellulosegehalte der Zellwände (A) und Kulturmedien (B) von 2,4D-haltigen und 2,4D-freien Kulturen in Abhängigkeit von der Kultivierungsdauer.

Der Gesamtkohlenhydratgehalt der Zellwände der 2,4D-haltigen Kultur blieb bis zum 2. d annähernd gleich, anschließend fiel er aber bis zum 4. d auf 1/3 des Anfangswertes, um dann wieder bis zum 10. d leicht anzusteigen (Abb. 3-31). Der Gesamtkohlenhydratgehalt der 2,4D-freien Kultur sank bis zum 4. d auf 50 % des Anfangswertes, stieg in den folgenden beiden Tagen wieder geringfügig an und fiel dann bis zum Ende der Kultivierung wieder leicht ab.

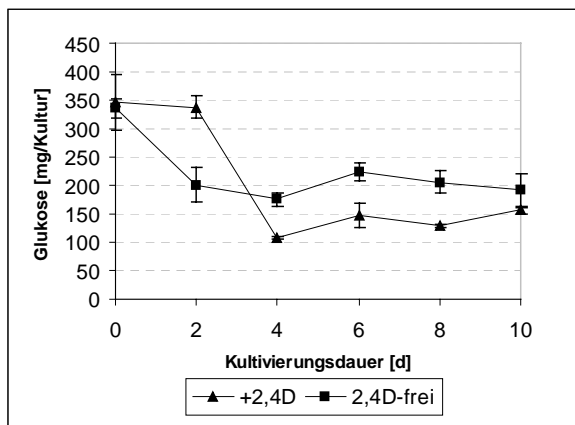
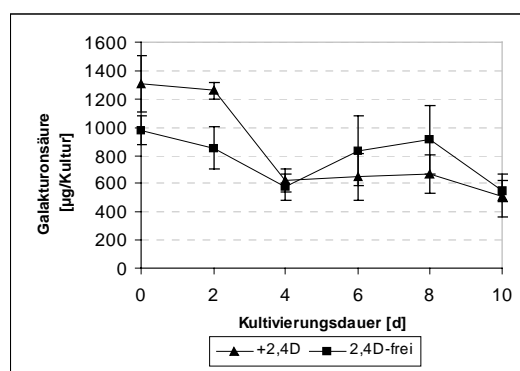


Abb. 3-31: Änderung der Gesamtkohlehydratgehalte der Zellwände im Verlauf der Kultivierung.

Der Hauptbestandteil des Pektins ist Galakturonsäure. Deshalb untersuchten wir auch den Gehalt an Galakturonsäure in den Zellwänden beider Kulturen. In den Zellwänden der 2,4D-haltigen Kultur nahm der Galakturonsäuregehalt in den ersten vier Kultivierungstagen um 50 % ab (Abb. 3-32 (A)). In den nächsten vier Tagen blieb der Wert dann annähernd gleich, um anschließend leicht abzusinken. Der Anfangswert des Galakturonsäuregehaltes in den Zell-

wänden der 2,4D-freien Kultur war geringer als in Zellwänden der 2,4D-haltigen Kultur. Auch hier nahm der Gehalt an Galakturonsäure bis zum 4. Kultivierungstag ab, stieg jedoch in den folgenden vier Tagen wieder an und erreichte fast den Anfangswert, um abschließend wieder bis auf den Wert der 2,4D-haltigen Kultur abzusinken. Im Kulturmedium nahm der Galakturonsäuregehalt der 2,4D-haltigen Kultur in den ersten beiden Tagen um ca. die Hälfte des Ausgangswertes zu und fiel in den darauffolgenden Tagen wieder kontinuierlich ab (Abb. 3-32 (B)). Bei der 2,4D-freien Kultur verdoppelt sich der Galakturonsäuregehalt in den ersten vier Tagen. Dann blieb er bis zum 8. d ungefähr gleich bevor er bis zum 10. d wieder abnahm.

A



B

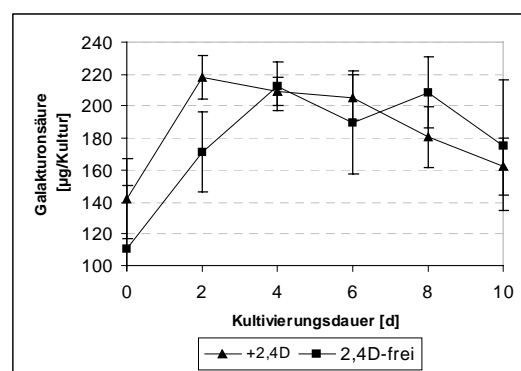


Abb. 3-32: Zeitlicher Verlauf der Galakturonsäuregehalte in den Zellwänden (A) und Kulturmedien (B) von 2,4D-haltigen und 2,4D-freien Kulturen.

Zusammenfassend kann man also feststellen, daß in Bezug auf die Zusammensetzung der Hauptbestandteile der Zellwände zwischen beiden Kulturen keine signifikanten Unterschiede bestehen, die die extrazelluläre Akkumulation von CBP20 bewirken könnten.

Auf die Zellwandbeschaffenheit könnte auch der pH-Wert des Mediums einen Einfluß nehmen. Im Zusammenhang mit den oben genannten Untersuchungen wurde der pH-Wert der Medien nach der Probenahme analysiert. Hierbei stellten wir fest, daß dieser unabhängig vom Kultivierungsmedium innerhalb der ersten beiden Tage abnahm, anschließend stieg er wieder an und erreichte in der 2,4D-freien Kultur pH 5,52 und in der 2,4D-haltigen Kultur pH 5,05 (Abb. 3-33).

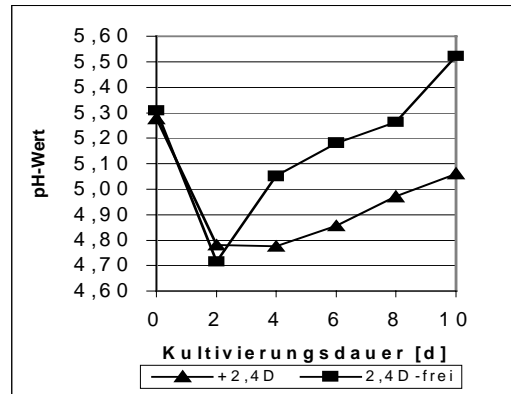


Abb. 3-33: Zeitlicher Verlauf der pH-Werte in den Kulturmedien während der Kultivierung.

3.1.5.7 Untersuchungen zur Art der Bindung von CBP20 an die Zellwand

Die Art bzw. Stärke der Bindung des Proteins CBP20 an die Zellwand könnte seine Akkumulation ins Kulturmedium beeinflussen. Für die Untersuchung der Bindungsart wurden Zellwände von Zellen, die in Gegenwart bzw. Abwesenheit von 2,4D kultiviert worden waren, nach 6tägiger Subkultivierung präpariert, wobei für die Ablösung der an die Zellwand gebundenen Proteine folgende Puffer verwendet wurden: 1.) Natriumphosphat-Puffer (3 mM Na(P)-Puffer, pH 7,5/1 M NaCl) und 2.) TNT-Puffer (500 mM NaCl/0,02 % Triton X100/50 mM Tris-HCl, pH 8,0) für die Extraktion ionisch gebundener Proteine, 3.) ein Zuckergemisch (125 mM Raffinose/125 mM Saccharose/125 mM Maltotriose/125 mM Melobiose) für die Extraktion von Proteinen, die auf Grund einer Affinität zu Kohlenhydraten an die Zellwand gebunden sind und 4.) SDS-Puffer (3 mM Na(P)-Puffer, pH 7,5/0,05 % SDS/0,05 % Tween 20) für die Extraktion von Proteinen, die durch hydrophobe Wechselwirkungen an die Zellwand haften. Die erhaltenen Proteinextrakte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf eine PVDF-Membran für Westernblotexperimente eingesetzt. CBP20 konnte unabhängig vom Kultivierungsmedium nur mit den salzhaltigen Natriumphosphat- und TNT-Puffern vollständig aus der Zellwand herausgelöst werden, daß heißt, daß CBP20 ionisch an der Zellwand gebunden wird. Im nächsten Versuch wurden Zellwandpräparationen von 6 d alten Zellen mit Natriumphosphat-Puffer mit variablen NaCl-Konzentrationen extrahiert und für Westernblotexperimente eingesetzt. In Zellwänden der 2,4D-haltigen Kultur konnte CBP20 mit Natriumphosphat-Puffer mit einer NaCl-Konzentration von 0,05 M abgelöst werden (Abb. 3-34 (A)). Demgegenüber war in 2,4D-freien Kulturen eine NaCl-Konzentration von 0,15 M im Natriumphosphat-Puffer nötig, um eine schwache CBP20-Bande nachzuweisen und erst bei 0,25 M NaCl erreichte hier die Bande die gleiche Intensität, wie in 2,4D-haltigen Kulturen. Das bedeutet, CBP20 wird in Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium unterschiedlich stark an die Zellwand gebunden.

Es stellte sich nun die Frage, ob sich die Extrahierbarkeit des Proteins im Laufe der Kultivierung ändert. Es wurden Zellen nach 10 tägiger Subkultivierung, wie oben beschrieben, aufgearbeitet und für Westernblotexperimente eingesetzt. Überraschenderweise nahm offenbar die Bindungsstärke der Proteine an die Zellwand im Laufe der Kultivierung zu, denn in 2,4D-haltigen Kulturen waren 0,15 M NaCl im Natriumphosphat-Puffer nötig, um CBP20 abzulösen. Auch bei 2,4D-freien Kulturen kamen wir zu einem analogen Ergebnis, denn auch nach Einsatz von 0,25 M NaCl war noch keine CBP20-Bande nachweisbar.

Dieses Bindungsverhalten traf auch auf die CHN der Klasse I zu, die dem Protein CBP20 sehr ähnlich ist (Abb. 3-34 (B)).

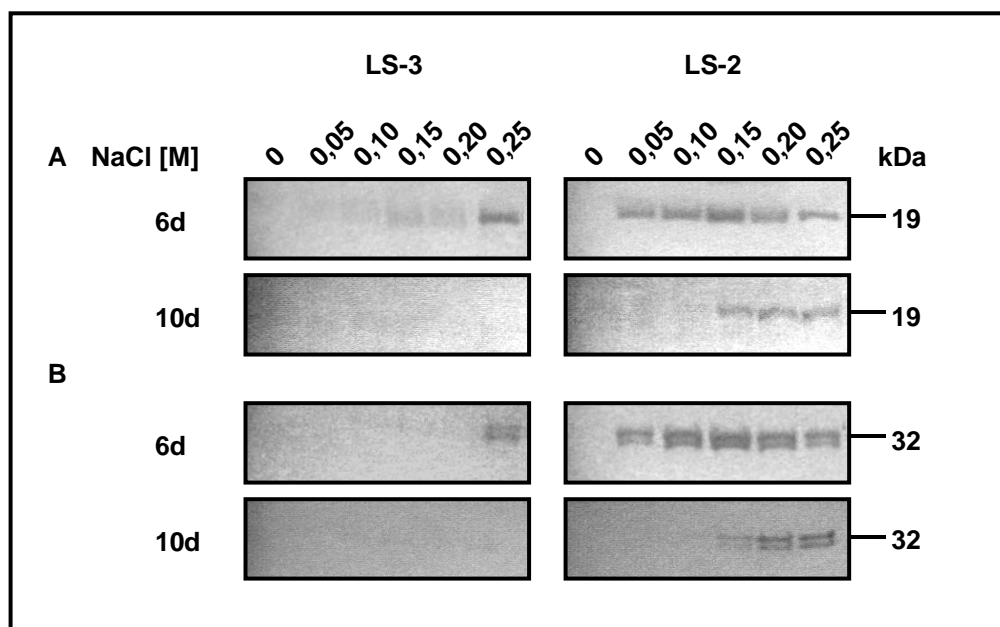


Abb. 3-34: Einfluß von verschiedenen NaCl-Konzentrationen auf die Extrahierbarkeit von CBP20 (A) und CHN (B) aus Zellwänden von Suspensionskulturen, die in 2,4D-haltigem und 2,4D-freiem Medium für 6 bzw. 10 d subkultiviert wurden. Es wurden Aliquote der einzelnen Extrakte in der SDS-PAGE aufgetrennt und parallele Gelblots mit den Antikörpern Anti-CBP20 und Anti-CHN behandelt.

3.2 Untersuchungen in der Hefe

3.2.1 Expression des Pflanzengens *CBP20* in *Saccharomyces cerevisiae*

Um den innerzellulären Transportweg des Pflanzengens *CBP20* untersuchen zu können, wurde die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modell genutzt. Hierfür wurde der Mutantenstamm CI3ABYS86 eingesetzt, der Defekte für die vakuolären Proteasen A, B und CPY aufwies, so daß dieser für die heterologe Genexpression geeignet schien (Bröker *et al.*, 1991).

3.2.1.1 Klonierung von GFP und der Genfusionen *CBP20-GFP* und *N-GFP-V* und Transformation in den *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm CI3ABYS86

Um den innerzellulären Transport von CBP20 in der Hefe verfolgen zu können, nutzten wir die fluoreszierende Eigenschaft des GFP-Proteins. Es wurden 3 Konstrukte in die Hefe CI3ABYS86 transformiert. Konstrukt 1 war ein chimäres Gen aus *CBP20* und *GFP*, wobei *CBP20* C-terminal mit *GFP* verbunden wurde. Konstrukt 2 enthielt die cytosolische Variante von GFP, daß heißt es fehlte eine Signalsequenz für die Aufnahme ins ER. Bei Konstrukt 3 wurde das cytosolische *GFP*-Gen mit den Signalsequenzen (N-terminale Signalsequenz für die ER-Aufnahme und C-terminale Sequenz für das VTP) der pflanzlichen CHN der Klasse I fusioniert (Abb. 3-36).

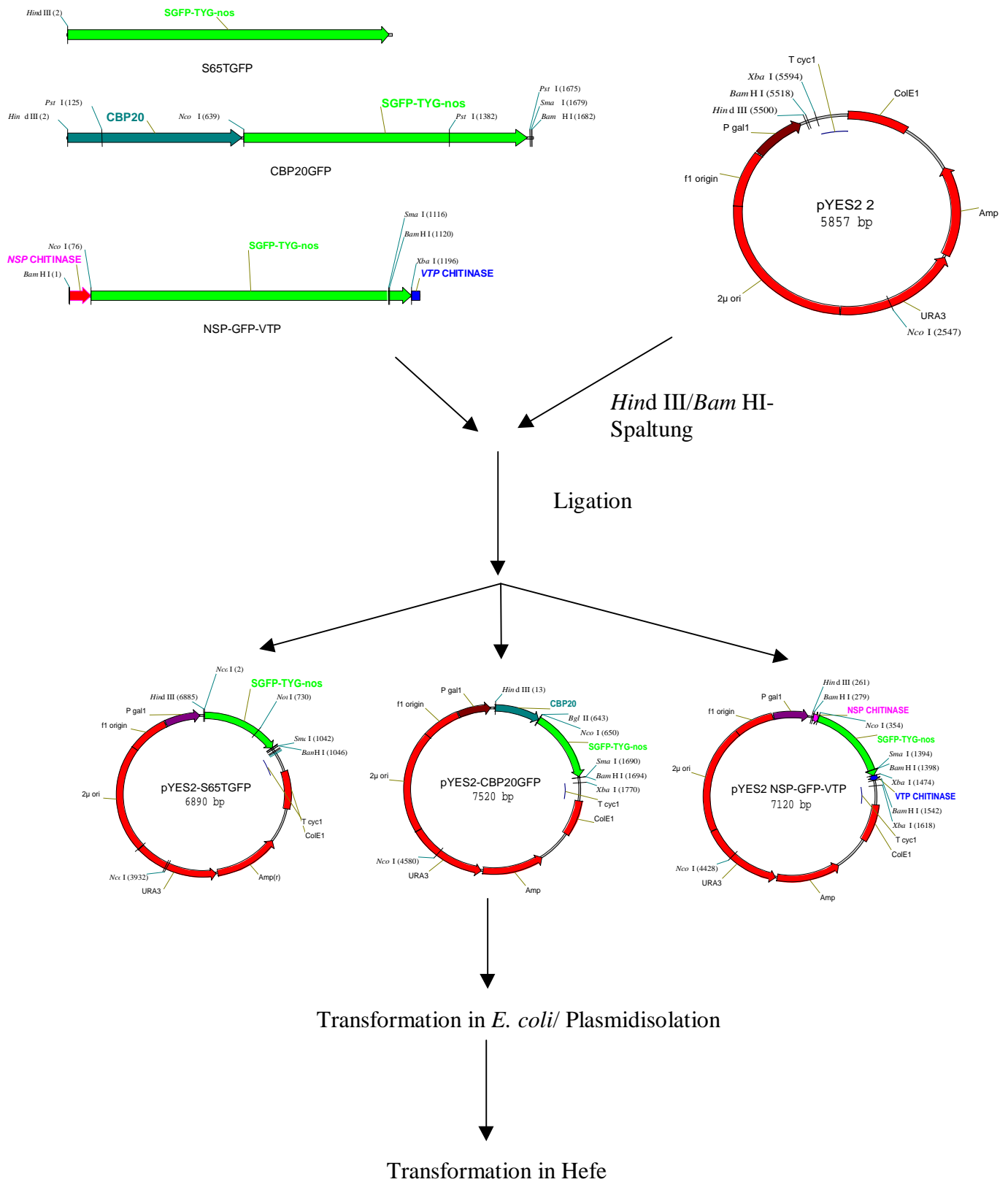


Abb. 3-36: Klonierungsschema der Fusionsprodukte mit GFP

3.2.1.2 Akkumulation von GFP und der Fusionsproteine in Zellextrakten und Kulturmedien während der Kultivierung

Von großem Interesse war die Frage: „Wo GFP und die Fusionsproteine während der Kultivierung lokalisiert werden?“. Befinden sich die Proteine in den erwarteten Zellkompartimenten oder werden sie ins Kulturmedium sekretiert? Um diese Fragen zu klären, wurden die Stämme, die die Proteine GFP, CBP20-GFP und N-GFP-V exprimieren, in einer ÜNK in YNB-Medium mit 2 % Glukose bis zu einem $OD_{600} = 0,6 - 1$ kultiviert. Da alle transformierten Konstrukte unter die Kontrolle des *GAL1*-Promotors gestellt wurden, erfolgte anschließend die Induktion der Genexpression durch Umsetzen in ein Galaktose-haltiges Medium. Nach 0, 6, 24 und 48 h wurden die Zellen vom Medium getrennt. Das Kulturmedium wurde mit Centricell-Einheiten (Sartorius/Deutschland) ca. 60fach konzentriert und die Proteine mit SDS denaturiert. Die Proteine der Zellen wurden mit TNT-Puffer extrahiert und mit SDS denaturiert. In einer SDS-PAGE wurden die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine PVDF-Membran „geblottet“. Danach wurden die Membranen mit einem Anti-GFP-Antikörper (Molecular Probes, USA) behandelt. In Abb. 3-37 wurde ein Westernblot mit dem zeitlichen Verlauf der Lokalisation von GFP (A) und den Fusionsproteinen CBP20-GFP (B) und N-GFP-V (C) dargestellt. In den Bahnen 1-4 wurden die Zellextrakte und in den Bahnen 5-8 die Kulturmedien in zeitlicher Reihenfolge aufgetragen. Beide Fusionsproteine waren bereits 6 h nach Induktion als schwache Bande nachweisbar. Die Intensität der Bande nahm im weiteren Verlauf der Kultivierung bis zu 24 h weiter zu und blieb dann bis zu 48 h unverändert. In Zellextrakten der Transformante, die die cytosolische GFP-Variante war erst nach 24 h eine Polypeptidbande in den Zellen nachweisbar, deren Intensität auch bis zu 48 h Kultivierung nicht weiter zunahm. Im Kulturmedium aller 3 Transformanten war kein Protein nachweisbar.

Mit Hilfe der Confocalen Laser Scanning Microscopie sollte anschließend geklärt werden, in welchem Zellkompartiment bzw. welchen Zellkompartimenten die Proteine akkumuliert werden.

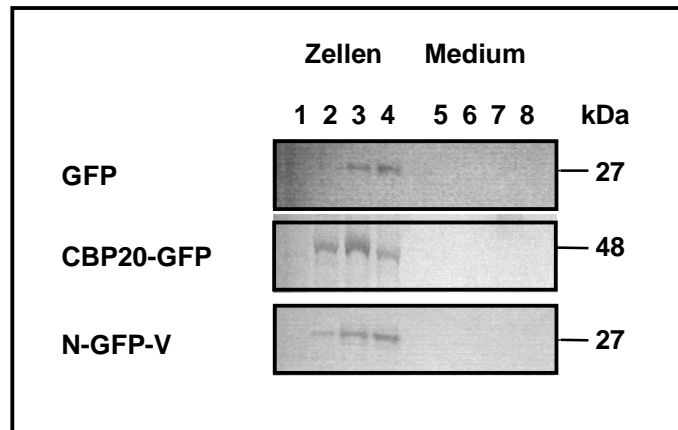


Abb. 3-37: Westernblot zum Nachweis von GFP und den beiden Fusionsproteinen CBP20-GFP und N-GFP-V in der Hefe CI3ABYS86 nach unterschiedlich langer Induktion auf Galaktose. Es wurden Aliquote von Zellextrakten und konzentrierten Kulturmedien der Stämme mit GFP, CBP20-GFP und N-GFP-V nach 0 h (1, 5), 6 h (2, 6), 24 h (3, 7) und 48 h (4, 8) für den Nachweis mit Anti-GFP-Antikörpern genutzt.

3.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen mit Hilfe der Confocalen Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Für die innerzelluläre Lokalisation des GFP wurden die 3 Transformantenstämme, die das cytosolische GFP und die beiden Fusionsproteine CBP20-GFP und N-GFP-V enthielten, in flüssigem YNB-Medium mit 2 % Glukose angezogen, bis sich die Kultur in der log. Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,6 - 1$) befand. Danach wurden sie zur Induktion in flüssiges YNB-Medium mit einer Endkonzentration von 2 % Galaktose umgesetzt. Nach 20 h wurden die Zellen vom Medium getrennt und mit den Farbstoffen FM4-64, der die Tonoplastenmembran der Vakuole färbt und DAPI, der den Zellkern färbt, behandelt. Anschließend erfolgte der mikroskopische Nachweis der DAPI, FM-64 und GFP bedingten Fluoreszenz. Wie in Abb. 3-38 zu sehen ist, war das GFP-Protein ohne Signal für die ER-Aufnahme im Cytosol der Hefezelle akkumuliert. Das Fusionsprotein CBP20-GFP war in der Vakuole, aber auch in punktförmigen Kompartimenten der Zelle außerhalb der Vakuole lokalisiert. Das Fusionsprotein N-GFP-V mit den Signalsequenzen der pflanzlichen CHN der Klasse I befand sich ausschließlich in der Vakuole der Hefezellen. Analoge Experimente unter Verwendung der CHN haben ergeben, daß die extravakuoläre Lokalisation des CHN-GFP Fusionsproteins durch einen zeitlich verzögerten Transport des Proteins zustande kommt und eine vorübergehende Akkumulation in ER-abgeleiteten Kompartimenten – möglicherweise in Folge einer inkompletten Faltung – erfolgte (Kunze *et al.*, 1999).

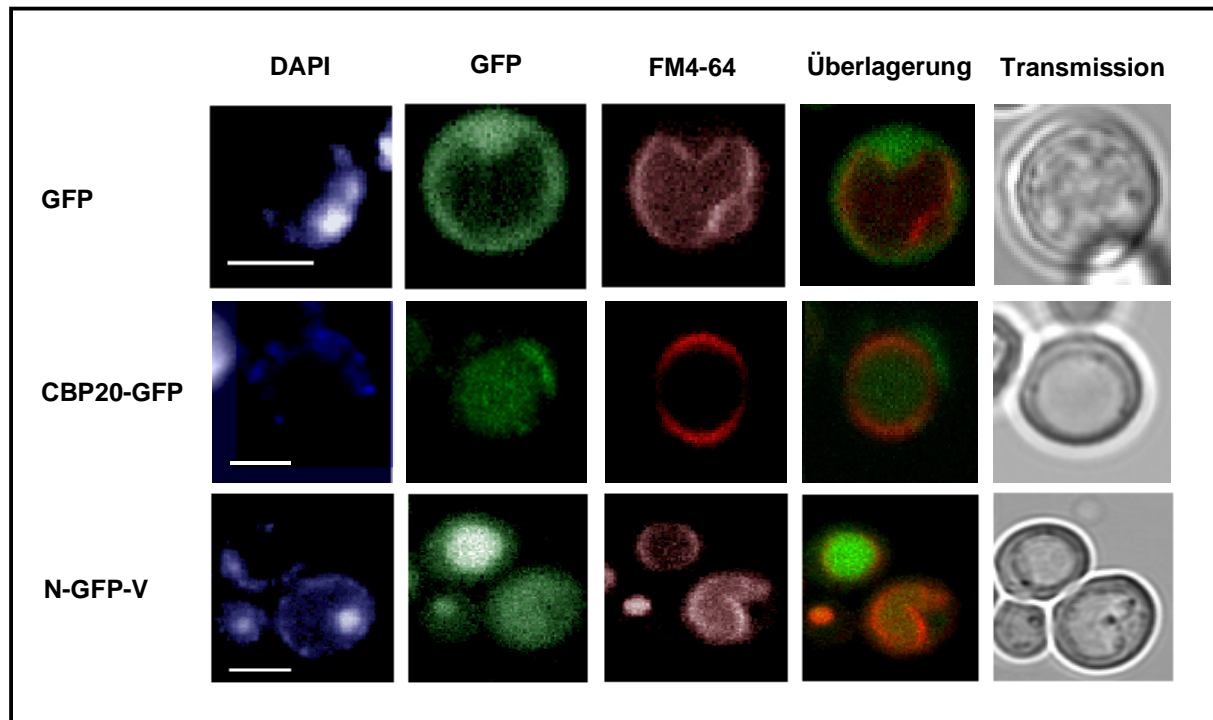


Abb. 3-38: Mikroskopische Lokalisierung von GFP und den Fusionsproteinen CBP20-GFP und N-GFP-V in der Hefe Cl3ABYS86 nach 20stündiger Induktion in Galaktose-haltigem Medium.

4 Diskussion

Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand ein ca. 20 kDa großes, sekretorisches Protein, das trotz Blockierung der klassischen Sekretionsroute durch BFA im Medium von Tabaksuspensionskulturen akkumuliert wurde. Da der Export der meisten sekretorischen Proteine durch BFA nahezu komplett inhibiert werden konnte, gehörte dieses Protein zu den wenigen Proteinen, die fast uneinträchtigt im Kulturmedium akkumuliert wurden (Kunze *et al.*, 1995). Deshalb wurde das 20 kDa große Protein für eine detaillierte Analyse im Rahmen dieser Arbeit ausgewählt.

Die Analyse seiner N-terminalen Aminosäureteilsequenz sowie die Isolierung und Sequenzierung der entsprechenden cDNA führten zur Identifizierung des Proteins. Es handelt sich um das Protein CBP20, das von Ponstein *et al.* (1994) aus Tabakblättern, die mit dem TMV infiziert worden waren, nachgewiesen und als PR-4 Protein der Klasse I identifiziert worden ist. Die Isolation der cDNA von CBP20, sowie potentieller Promotorregionen für die entsprechende Genfamilie und das ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit hergestellte polyklonale Antiserum gegen CBP20 ermöglichten detaillierte Untersuchungen zur Lokalisation und Induzierbarkeit seiner Akkumulation, zur Regulation der Expression sowie zum innerzellulären Transport von CBP20.

4.1 Die Induzierbarkeit der CBP20 Akkumulation ähnelt der anderer PR-Proteine der Klasse I codierender Gene.

Bei unseren Untersuchungen zur Akkumulation und Induzierbarkeit des Tabak PR-4 Proteins CBP20 konnten wir nachweisen, daß das Protein CBP20 ebenso wie bei einigen anderen basischen PR-Proteinen auch, konstitutiv in der Wurzel und alten Blättern akkumuliert wird und seine Synthese durch Verwundung induziert wird.

Da die meisten basischen PR-Proteine durch Verwundung induziert werden, wurde deren Einfluß auf die Protein- und Transkriptkonzentration von CBP20 untersucht. Bei den Northernblotexperimenten zum Einfluß der Verwundung können wir die Ergebnisse von Ponstein *et al.* (1994) bestätigen. Nach einer 20stündigen Verwundung haben wir ein starkes CBP20 Signal (siehe Abb. 3-6). Dies bestätigt auch die Befunde anderer Gruppen, daß basische PR-Proteine durch Verwundung induziert werden können (Brederode *et al.*,

1991; Bol *et al.*, 1996; Pieterse and Van Loon, 1999). Bei der Analyse, ob Verwundung auch zu einer erhöhten Proteinakkumulation führt, wurden wie für die Northernblotanalyse junge Blätter und zusätzlich Sproß und Wurzel verschieden lang verwundet, die Proteine extrahiert und dann für den Westernblot eingesetzt. Hierbei stellten wir allerdings fest, daß eine Verwundung bis zu 20 h keinen Einfluß auf das CBP20-Protein hat (Abb. 3-7), was uns vermuten läßt, daß die Expression von CBP20 transkriptional als auch post-transkriptional reguliert ist.

Bei der Untersuchung zur Verteilung von CBP20 in Suspensionskulturen und *in vitro*-Pflanzen des Tabak konnten wir feststellen, daß CBP20 in Zellen der Suspension und in der Wurzel von *in vitro*-Pflanzen konstitutiv akkumuliert wird (siehe Abb. 3-2). Memelink *et al.* (1990) zeigten für basische PR-Proteine eine Akkumulation in älteren Blättern und in der Wurzel. Wir konnten, sowohl bei Gewächshaus-, als auch bei *in vitro*-Pflanzen zeigen, daß die Akkumulation von CBP20 mit dem Blattalter zunahm (Abb. 3-3). Seneszenz ist das letzte Entwicklungsstadium der Pflanzen. Sie ist stark reguliert und genetisch programmiert. Blattzellen durchleben eine Umorganisation der Zellorganellen und eine dramatische Veränderung des Zellmetabolismus (Biswal and Biswal, 1988; Nooden, 1988; Smart, 1994; Thomas, 1980). Die Blattseneszenz wird begleitet durch die Induktion verschiedener Gene. Dies sind hauptsächlich am Abbau beteiligte Enzyme, wie Proteasen und Nukleasen (Thomas, 1980; Davies and Grierson, 1989). Zusätzlich zu den Proteasen konnte auch die seneszenzbedingte Induktion einiger PR-Proteine (hauptsächlich CHN unterschiedlicher Klassen und Proteinen der Gruppe 1) nachgewiesen werden (Hanfrey *et al.*, 1996; Lotan *et al.*, 1989; Fraser, 1981).

Salicylsäure (SA) ist eines der entscheidenden Signale bei der Signaltransduktion (Hennig *et al.*, 1993; Ward *et al.*, 1991; Yalpani *et al.*, 1991; Verwoij *et al.*, 1994), die auch zur Induktion von PR-Proteinen führt (Bol *et al.*, 1996; Yalpani *et al.*, 1991; Ohashi and Matsuoka, 1987). Um zu überprüfen, über welchen Mechanismus CBP20 induziert wird, haben wir den Einfluß der SA auf die Expression von CBP20 getestet. In den Kontrollpflanzen konnten wir, wie erwartet, CBP20 in alten Blättern und der Wurzel nachweisen. Nach Inkubation mit SA erhielten wir zusätzlich auch in jungen und mittelalten Blättern eine CBP20-Bande (siehe Abb. 3-8 A). Im Gegensatz dazu erhielten wir

bei einem weiteren basischem PR-Protein, nämlich der CHN der Klasse I, keine Erhöhung der Proteinakkumulation (siehe Abb. 3-8 B).

Bei Tabak sind laut Pieterse und van Loon (1999) zwei verschiedene Wege der Immunantwort auf Pathogene bekannt (siehe Einleitung). Im Ersten bewirkt SA die sogenannte „systemic acquired resistance“ und somit die Induktion saurer PR-Proteine, wie z.B. saure GLN (PR-2) und saure CHN (PR-3), sowie auch Gene von PR-1, PR-4 und PR-5 (siehe Niki *et al.*, 1998). Beim zweiten Weg werden hauptsächlich die basischen Vertreter der PR-Proteine durch Ethylen induziert (Meins *et al.*, 1991). Die Expressionsanalyse eines „Hevein-like Proteins“ (HEL), welches zu den PR-4 Proteinen gehört, zeigte, daß die Akkumulation seiner m-RNA stark durch Ethylen und weniger stark durch SA induziert wurde (Potter *et al.*, 1993). Die Klassifikation in diese zwei Induktionswege beruht meist auf quantitativen Unterschieden bei der Akkumulation der Transkripte wogegen die daraus gebildeten Proteine meist nicht untersucht wurden.

Die Akkumulation von CBP20 als basischem Vertreter der PR-Proteine wird genauso wie die basische CHN durch Ethylen stark induziert (Ponstein *et al.*, 1994). Jedoch unterscheidet es sich von den anderen basischen PR-Proteinen durch seine zusätzliche Induktion durch SA. Es wäre also möglich, daß CBP20 in einem anderen Signaltransduktionsweg involviert ist.

4.2 Die Synthese des Proteins CBP20 wird durch Schwermetalle beeinflusst.

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Akkumulation einiger PR-Proteine durch Schwermetalle induziert werden konnte (Chai *et al.*, 1998), sollte der Einfluß von Silbernitrat, Cadmiumsulfat, Cobaltchlorid, Kupfersulfat und Zinkchlorid auf die Expression von CBP20 in Tabaksuspensionskulturen und *in vitro*-Pflanzen untersucht werden.

Die Behandlung von Tabaksuspensionskulturen und jungen *in vitro* Blättern mit Zinkchlorid bewirkt offensichtlich eine erhöhte CBP20 Proteinkonzentration (Abb. 3-9 und Abb. 3-11). Andere Schwermetalle wie Silbernitrat, Cadmiumsulfat, Cobaltchlorid und Kupfersulfat bei Suspensionskulturen und Cobaltchlorid bei Blättern von *in vitro*-Pflanzen bewirken in der verwendeten Konzentration keine Erhöhung der Proteinkonzentration.

Eine Erhöhung der CBP20-Transkriptkonzentration kann entweder durch eine echte Induktion der Synthese der m-RNA oder durch eine veränderte Stabilität der m-RNA bewirkt werden. Um zwischen beiden Möglichkeiten unterscheiden zu können, haben wir die m-RNA-Synthese nach Induktion durch Zinkchlorid und in einem seneszenten Blatt durch Zugabe von Actinomycin D blockiert. Im Ergebnis dessen konnten wir zeigen, daß Zinkchlorid nicht zu einer erhöhten Stabilität der CBP20 m-RNA führt. Das bedeutet, daß die Erhöhung der Transkriptkonzentration durch Zinkchlorid die Folge einer echten Induktion und nicht einer erhöhten Stabilität der CBP20 m-RNA ist. Ein reduzierter RNA-Umsatz („Turnover“) kann aber im Falle der Blattalterung nicht ausgeschlossen werden. Es wurde schon für einige Pflanzengene gezeigt, daß äußere Signale die RNA-Stabilität beeinflussen (Dickey *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1994; Lincoln and Fisher, 1988; Shirley and Meagher, 1990; Zhang *et al.*, 1993). So zeigten z.B. Zhang *et al.* (1993) das die Behandlung von kultivierten Bohnenzellen mit einem pilzlichen Elicitor den Transkriptspiegel verringert, daß dies aber nicht aufgrund einer reduzierten Gentranskription sondern durch eine Destabilisierung der m-RNA geschieht.

Metall-Ionen wie Cu^{2+} und Zn^{2+} sind essentielle Spurenelemente und sind an Redoxreaktionen, am Elektronentransfer und einer Menge von enzymkatalysierten Reaktionen beteiligt und haben eine strukturelle Funktion im Nukleinsäuremetabolismus. Die gleichen Schwermetalle wirken ebenso wie die stärkeren Ionen Cd^{2+} , Hg^{2+} , Ag^{2+} usw. stark toxisch auf Metall-sensitive Enzyme, woraus ein vermindertes Wachstum und der Tod des Organismus resultiert. Schwermetalle bewirken eine starke Veränderung der Genexpression, was Veränderungen im Proteinmuster zur Folge hat (De Tapia *et al.*, 1986; Margis-Pinheiro *et al.*, 1993). Häufig werden dadurch Metall-bindende Polypeptide, sogenannte Phytochelatine (Steffens, 1990) und andere stress-bedingte Proteine (Didierjan *et al.*, 1996) akkumuliert.

Chai *et al.* (1998) beschrieben die Expression eines 11 kDa großen, Prolin-reichen Proteins (PRP) in der Bohne nach Behandlung mit HgCl_2 , CdCl_2 , ZnCl_2 und CuSO_4 . Sie vermuten, daß die Tyrosin-reichen PRPs bei Stresssituationen verstärkt gebildet werden, um eine Zellwandverstärkung durch Isodityrosin-Querverbindungen zu bewirken.

Schwermetalle können ebenfalls die Akkumulation von Glycin-reichen Proteinen (GRPs) induzieren (Didierjan *et al.*, 1992, 1996). GRPs gehören wie die PRPs zu den Zellwandproteinen (Review: Condit and Keller, 1990). Studien in der Petunie und der Bohne haben gezeigt, daß GRPs strukturelle Zellwandproteine sind, die eine entscheidende Funktion im pflanzlichen Gefäßsystem und bei der Wundheilung haben. In Kulturen der Sojabohne wurden GRPs in lignifizierenden Zellwänden des Phloem und des primären und sekundären Xylem nachgewiesen, was vermuten läßt, daß GRPs die Kristallisationsstelle der Lignifizierung vorbereiten (Ye and Varner, 1991). Nicht zellwandgebundene GRPs werden als Antwort auf Verwundung, Wasserstress und ABA-Behandlung verstärkt akkumuliert, was eine mögliche Rolle der Proteine beim Trockenstress bzw. bei der Wundheilung vermuten läßt (Showalter *et al.*, 1991). Interessanterweise enthält CBP20 ebenfalls eine Glycin-reiche Region mit 14 Glycin-Resten und zwei zusätzlichen G-G Wiederholungen und wir konnten CBP20 auch in Zellwänden von Tabaksuspensionskulturen nachweisen (vgl. 4.4).

Nach den erhaltenen Daten zum Schwermetalleinfluß auf die Akkumulation von CBP20 stellte sich die Frage: „Haben Veränderungen der CBP20-Konzentration Einfluß auf die Schwermetallresistenz?“. Eine Überexpression bzw. eine totale Repression des CBP20-Genes wurde durch die Herstellung von transgenen „sense“- bzw. „antisense“-Pflanzen erreicht. Überexpression ist eine oft verwendete Strategie um die Überproduktion eines spezifischen Proteins zu erreichen oder um zu einem veränderten Fluß im Stoffwechsel zu kommen. „Antisense“-Konstrukte führen dagegen oft zur Reduzierung der Ziel-RNA, in dem sie mit dem Komplementär-Strang der m-RNA eine Doppel-Strang-Struktur ausbilden, wodurch die m-RNA abgebaut, ihre Prozessierung bzw. ihr Transport behindert oder ihre Translation verhindert wird (Mol *et al.*, 1994). In einigen Fällen wurde in der Literatur berichtet, daß „sense“-Gene zum „gene silencing“ (Gen-Stummschaltung) führen. Diese Stummschaltung ist in einigen Fällen mit einer DNA-Methylierung verbunden, wogegen in anderen Befunden von einer post-transkriptionalen Gen-Stummschaltung berichtet wird. Die Anwesenheit mehrerer Kopien eines Transgens bzw. Homologie zwischen dem WT-Gen und dem Transgen führt in einigen Fällen zu einer verminderten Expressionshöhe. Eine geringere Expression ist meist verbunden mit einer erhöhten Methylierung der T-DNA (Hobbs *et al.*, 1990; Linn *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1992), welche die Initiation oder Elongation der Transkription verhindert

(Barry *et al.*, 1993). Die Unterdrückung der GLN (De Carvalho *et al.*, 1992) und der Chalcon-Synthase (Mol *et al.*, 1991; Van Blokland *et al.*, 1993) durch ihr homologes Transgen sind klare Beispiele für einen post-transkriptionalen Stummschaltungs-Prozeß.

Bei einigen „sense“- bzw. „antisense“-Pflanzen kommt es je nach der Natur des Genes zu einer Veränderung des Phänotypes. So konnten Coles *et al.* (1999) für die Gibberellin-20-Oxidase in *Arabidopsis* zeigen, daß „sense“-Pflanzen im Vergleich zu Kontrollpflanzen größer werden und auch früher blühen, während „antisense“-Pflanzen einen kürzeren Stengel und eine verzögerte Blühphase haben. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bei anderen PR-Proteinen festgestellt. Um den Einfluß der GLN der Klasse I beim Pathogenbefall näher zu untersuchen, haben Beffa und Meins (1996) „antisense“-Pflanzen untersucht. Sie stellten dabei fest, daß die transgenen Pflanzen keine phänotypischen Veränderungen gegenüber Kontrollpflanzen aufwiesen, was zeigt, daß die GLN kein sogenanntes „House keeping-Gen“ ist. Weiterhin wurde die Induktion der GLN durch den Pilz *Cercospora nicotianae* stark gehemmt, was aber keine Auswirkungen auf die Heftigkeit der durch den Pilz verursachten Krankheitssymptome zeigte. Daraus schlußfolgerten sie, daß die GLN der Klasse I für die Abwehr der Tabakpflanze gegen dieses Pathogen wichtig ist. Sie schlossen aber nicht aus, daß auch andere GLN an der Krankheitsresistenz beteiligt sind.

Bei unseren transgenen CBP20-Pflanzen konnten wir zwar im Falle der „sense“-Konstrukte eine Akkumulation von CBP20 in allen Pflanzenorganen nachweisen, jedoch wissen wir zum momentanen Zeitpunkt nicht, ob dies auch zu einer empfindlicheren oder unempfindlicheren Reaktion bei den induzierenden Bedingungen (wie Verwundung oder durch Schwermetalle) führt. Es wäre vorstellbar, daß die „sense“-Pflanzen resistenter gegen einen Pathogenbefall durch den TMV sind. Da wir zeigen konnten, daß CBP20 auch durch das Schwermetall ZnCl_2 induziert wird, untersuchen wir momentan, ob vielleicht CBP20 „sense“-Pflanzen weniger empfindlich gegen das Schwermetall sind, als CBP20 „antisense“-Pflanzen.

4.3 Durch die Gen- und Promotoranalyse können Aussagen über die Synthese und Regulation des Gens CBP20 gemacht werden.

Die von uns isolierten 4 cDNA-Klone wiesen alle Sequenzhomologie zum Klon *cbp20-44* von Ponstein *et al.* (1994) auf. Diese hatten das Gen aus einer cDNA-Bank des Tabak nach TMV-Infektion isoliert. Ponstein *et al.* (1994) zeigten durch Southernblotexperimente weiterhin, daß CBP20 ein Mitglied einer kleinen Genfamilie, bestehend aus mindestens 2 Mitgliedern, *cbp20-44* und *cbp20-52*, ist.

Die von uns nach PCR mit genomischer DNA erhaltenen potentiellen Promotorfragmente unterschieden sich zum einen in der Größe und zum anderen in der Sequenz. So zeigte Fragment *CBP20/1* im 3'-Bereich Homologie zum Klon *cbp20-52* während *CBP20/2* und *CBP20/3* im 3'-Bereich Homologie zum Klon *cbp20-44* aufwies. Die beiden Letzteren unterschieden sich zudem am 5'-Ende. Hier enthielt *CBP20/2* eine Insertion von 18 Basen mit einer Wiederholung der sogenannten GC-Box.

Die von uns ermittelten 3 potentiellen Promotorsequenzen *CBP20/1-3* zeigten im Vergleich der Nukleinsäuren Homologien zu Promotorelementen anderer PR-Proteine. So war die als sogenannte GC-Box bekannte Sequenz TAARAGCCGCC (wobei R meist für G steht) in den Promotoren *CBP20/1* (-636/-625) und *CBP20/3* (-400/-389) je einmal und in Promotor *CBP20/2* (-419/-408 und -401/-390) zweimal enthalten. Diese GC-Box ist in allen durch Ethylen induzierbaren Promotoren der basischen *CHN*- und *GLN*-Gene aber auch einer neutralen Isoform des *OLP*-Genes enthalten (Ohme-Takagi and Shinshi, 1990; Shinshi *et al.*, 1995; Sato *et al.*, 1996). Hier konnte durch Promotor-GUS-Fusionen gezeigt werden, daß diese Sequenzbereiche für die Induzierbarkeit durch Ethylen benötigt werden. Fehlt die AGCCGCC-Sequenz kommt es zur Verminderung der GUS-Expression, was beweist, daß diese Sequenz ein DNA-Element ist, welches auf Ethylen reagiert. Weiterhin konnten Ohme-Takagi and Shinshi (1995) zeigen, daß EREBP-Proteine (ethylen-responsive element binding protein) an diese Sequenz spezifisch binden. EREBP's sind DNA-Bindeproteine, die unverzichtbar bei der Regulation der Transkription sind und deren Akkumulation durch Ethylen induziert wird.

Ein weiteres DNA-Element, das bisher in Promotoren von PR-1 Proteinen und Licht-induzierbaren Genen nachgewiesen wurde, die GT-1 Bindungsstelle, ist ebenfalls in allen drei isolierten Promotorsequenzen enthalten. GT-1 ist als genereller Transkriptionsfaktor bekannt, welcher konservierte Bindungsstellen verschiedener induzierbarer Gene in unterschiedlichen Pflanzenspezies erkennt. GT-1 Bindungsstellen wurden bisher im Promotor des *rbcS-3A*-Gens der Bohne (Green *et al.*, 1988, 1989), sowie der Licht-induzierbaren Gene *ferredoxin I* der Bohne (Elliott *et al.*, 1989), des *phytochrom*-Gens von Reis (Kay *et al.*, 1989) und des *Nicotiana plumbaginifolia* Chlorophyll a/b-Bindungsproteins (Schindler and Cashmore, 1990) nachgewiesen. In der nachfolgenden Tabelle sind die potentiellen GT-1 Bindesequenzen nach Green *et al.* (1988) für die 3 Promotoren und ihre Position im Sequenzbereich angegeben.

Tab. 4-1: Tabelle für die Position potentieller GT-1 Bindungsstellen in den Sequenzen der Promotoren *CBP20/1-3*. (rev) kennzeichnet die Sequenz des Gegenstranges.

Sequenz für GT-1 Bindungsstelle	Position im Promotor <i>CBP20/1</i>	Position im Promotor <i>CBP20/2</i>	Position im Promotor <i>CBP20/3</i>
GAAAAT	-530; -457; +22	-310; -6	--310; -6
GAAAAA	-490	-	-
GATAAA	-405; -45	-	-
GAAAAA (rev)	-311; -93	-120	-120
GTAAAT (rev)	-	-259	-259
GTTAAA (rev)	-	-178	-178
GGTAAT (rev)	-	-165	-165

Da CBP20 durch Ponstein *et al.* (1994) als ein durch UV-Licht induzierbares Protein beschrieben wird, wäre es möglich, daß diese Induktion über die GT-1 Bindungsstellen bewirkt wird.

Ein weiterer Transkriptionsfaktor, der bei der Induktion von PR-Promotoren beteiligt sein kann, sind die sogenannten WRKY-Proteine. Ihr Name beruht auf der WRKY-Domäne innerhalb der Proteinstruktur. An ihrem C-terminalen Ende wurde eine Struktur nachgewiesen, die Cystein- und/oder Histidin-Reste enthält, die in Verbindung mit einem einzelnen Zink-Atom eine Fin-

gerstruktur bilden. In einigen Fällen konnte gezeigt werden, daß diese „Zinkfinger“-Strukturen an der Bindung von DNA beteiligt sind (Rushton *et al.*, 1996; de Pater *et al.*, 1996; Rushton *et al.*, 1995). Die Bindung der Proteine wird durch „Elicitoren“ induziert. So konnten Meier *et al.* (1991) eine durch pilzliche „Elicitoren“ induzierte DNA-Bindungsaktivität an die W-Box, die durch die Sequenz TGAC gekennzeichnet ist, für das *PR1-1* Gen der Petersilie nachweisen. Auch im Promotor der CHN der Klasse I konnte ein solches „Elicitor“-spezifisches Element identifiziert werden (Fukuda, 1997; Fukuda and Shinshi, 1994; Yang *et al.*, 1999). Die WRKY-Proteine binden an Sequenzbereiche der Promotoren, die W-Box genannt werden. In den von uns isolierten potentiellen Promotoren war diese W-Box als Wiederholung, nur von 2 Nukleotiden unterbrochen, enthalten, wobei es Unterschiede zwischen *CBP20/1* und *CBP20/2* bzw. *CBP20/3* gab. Im Promotor *CBP20/1* befand sich die W-Box an Position –556 mit der Sequenz TGACATTTGAC, im Promotor *CBP20/2* an Position –344 mit der Sequenz TGACACTTGAC und im Promotor *CBP20/3* in Position –344 mit der Sequenz TGACACTTGAC (die Unterschiede sind unterstrichen dargestellt). Fukuda *et al.* (1997) beschreibt für die CHN der Klasse I eine ähnliche Sequenz. Hier wurde die Wiederholung der W-Box durch 4 Nukleotide getrennt (TGACTNNNTTGAC).

Eine sogenannte G-Box hat eine Funktion bei der Regulation verschiedener Gene durch Umwelteinflüsse wie z.B. Abscisinsäure (ABA), Licht, UV-Strahlung und Verwundung (Menkens *et al.*, 1995). Die G-Box gehört zur Familie der ACGT-haltigen Elemente, die bei der Expression einer Anzahl von Genen nach Pathogenbefall beteiligt sind (Kim *et al.*, 1992). Die G-Box bindet bZIP-Proteine, die als Transkriptionsfaktoren gut charakterisiert sind. bZIP-Proteine kommen ebenfalls in Tieren vor und sind hier für die positive bzw. negative Regulation verschiedener zellulärer Prozesse bekannt. Diese Proteine scheinen auch eine bedeutende Rolle bei der Aktivierung verschiedener Gene während der Streßabwehr der Pflanze zu spielen. Einen Beweis für die Bindung konnten Dröge-Laser *et al.* (1997) erbringen. Sie konnten zeigen, daß ein bZIP-Protein der Sojabohne an die G-Box des *Chs15*-Promotors der Bohne bindet. Da Ponstein *et al.* (1994) zeigen konnten, daß CBP20 durch UV-Bestrahlung und Verwundung induziert wird, könnten im Promotor auch G-Box Elemente enthalten sein. Wir konnten die G-Box Sequenz in allen 3 Promotoren nachweisen, bei *CBP20/1* einmal (Position -548) und bei *CBP20/2* (-374, -337) und *CBP20/3* (-373, -336) je zweimal.

Ein weiteres regulatorisches DNA-Element ist das „as-1-like“ Element, was durch die Sequenz CTGACGTAA codiert ist. *as-1* (oder *ocs*) wurde zuerst im 35S-Promotor des Cauliflower Mosaik Virus (CaMV) und den *nos*- und *ocs*-Promotoren von *Agrobacterium tumefaciens* identifiziert (Ellis *et al.*, 1993; Lam *et al.*, 1989). Das *as-1* Element wird durch unterschiedliche Signale, wie z.B. Salicylsäure, Auxine, Jasmonat und Wasserstoffperoxid angesprochen (Yang *et al.*, 1997). Diese Elemente binden ebenfalls an bZIP-Proteine, deren Bedeutung im vorherigen Abschnitt erklärt wurde. In unseren Promotoren waren ebenfalls potentielle *as-1* Elemente enthalten, nämlich bei *CBP20/1* in Position –550, bei *CBP20/2* in Position –339 und bei *CBP20/3* in Position –339. Dies untermauert unsere Ergebnisse, daß CBP20 durch Salicylsäure induziert wird. Erstaunlicherweise überlappen die *as-1* Elemente die Bereiche, in denen sich auch W-Box Sequenzen befinden. Es wäre vorstellbar, daß bei unterschiedlichen Signalen unterschiedliche Transkriptionsfaktoren an den selben Sequenzbereich binden.

Die in den meisten Promotoren enthaltene CAAT-Box war nur in Promotor *CBP20/1* in Position –352 enthalten. Die mögliche TATA-Box wurde unter zu Hilfenahme des Computerprogramms PCGENE ermittelt. Sie wurde für den Promotor *CBP20/1* in Position –24, Promotor *CBP20/2* in Position –52 und Promotor *CBP20/3* in Position –52 angegeben.

Bei der Isolation des genomischen Klonen von CBP20 stellten wir fest, daß das Gen zwischen den Basen 420 und 1452 ein Intron enthielt (siehe Abb. 3-1). Weil das so definierte Intron mit dem Dinukleotid Guanin-Thymin und mit dem Dinukleotid Adenin-Guanin endet, sagt man, daß die Spleißstellen der GT-AG-Regel entsprechen (Review: Padgett *et al.*, 1986). Es ist bekannt, daß auch andere Gene von PR-Proteinen Introns besitzen. Dazu zählen die zur Gruppe der PR-2 Proteine gehörenden GLN der Klasse I und die zur Gruppe der PR-3 Proteine gehörenden CHN der Klasse I.

4.4 CBP20 wird von Tabaksuspensionskulturen exportiert.

CBP20 sollte als basischer Vertreter der PR-4 Proteine in der Zelle (in der Vakuole) lokalisiert sein. Dennoch konnten wir zeigen, daß CBP20 in 2,4D-haltigen Suspensionskulturen extrazellulär akkumuliert wurde (siehe 3.1.5.1) und es auch in Zellwänden von suspensionskultivierten Zellen (siehe 3.1.5.4) nachweisbar war. Das gleiche Ergebnis konnte auch für die basischen Proteine

Chitinase und β -1,3-Glukanase gezeigt werden (Kunze *et al.*, 1998a). Wir konnten allerdings durch mehrere Kontrollexperimente ausschließen, daß diese Lokalisation nicht durch technisch bedingte Mängel wie z.B. Zellbruch hervorgerufen wurde. Es handelt sich also sehr wahrscheinlich um einen echten Transport zu diesen unterschiedlichen Bestimmungsorten, wobei man bei CBP20 nicht ganz ausschließen kann, daß ein Fehltransport durch Überexpression zustande kommen konnte. Denn entgegen den Untersuchungen zur CHN und GLN der Klasse I (Kunze *et al.*, 1998a) wird die Synthese von CBP20 durch 2,4D induziert.

Wir konnten bestätigen, daß der Export von CBP20 ins Medium durch 2,4D beeinflusst wird (siehe Abb. 3-22). Dies geschieht trotz der Erhöhung der CBP20-Transkriptkonzentration durch 2,4D nicht durch eine Überladung des vakuolären „Sortings“. In diesem Falle würden wir die unreife Form von CBP20 im Medium erwarten. Da das Molekulargewicht von CBP20 aber sowohl in den Zellen als auch im Medium 19 kDa beträgt und dies der Größe des reifen Proteins entsprach, können wir diese Möglichkeit ausschließen.

Man kann nun spekulieren, daß spezielle Streßsituationen zur Akkumulation von CBP20 in der Zellwand führt, um diese Zellen oder ihre Nachbarzellen vor Schäden durch Verwundung, Schwermetalle usw. durch einen noch unbekannten Mechanismus zu schützen.

Limam *et al.* (1997) konnten ebenfalls eine durch 2,4D bewirkte Peroxidase-Akkumulation in Zellen, der Zellwand und im Medium von *Catharanthus roseus* Suspensionskulturen nachweisen.

Bei unseren Untersuchungen zur C-terminalen Prozessierung des CBP20-Proteins konnten wir feststellen, daß bereits nach 1 h zwei Polypeptidbanden mit 21 und 19 kDa Größe und nach 3 h nur noch die Bande bei 19 kDa nachweisbar war (siehe Abb. 3-25). Die Reifung von CBP20 ist zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen, da Ponstein *et al.* (1994) das Molekulargewicht für das voll prozessierte Protein mit 19 kDa angibt. Der gleiche zeitliche Ablauf konnte auch für die GLN gezeigt werden. Deren Prozessierung wurde ausführlich von Sticher *et al.* (1992) untersucht. Sie beschreiben das die Reifung des Proenzyms sehr spät auf dem Weg zur Vakuole oder erst wenn ein vakuoläres Kompartiment erreicht wurde, stattfindet. Der Fakt, daß die GLN zusammen mit der

CHN der Klasse I im Medium von Tabaksuspensionen als reife Form akkumuliert wird, läßt vermuten, daß beide Proteine entweder ein prävakuoläres Kompartiment oder die Vakuole selbst auf ihrem Weg ins Medium passiert haben müssen (Kunze *et al.*, 1998a). CBP20 scheint im Bezug auf die Verteilung in Zellen und Medium und die Art der Prozessierung der GLN sehr ähnlich zu sein. Daraus kann man schlußfolgern, daß der von Kunze *et al.* (1998a) beschriebene Sekretionsweg der vakuolären Proteine ins Medium auch für das Protein CBP20 zutreffen könnte.

Proteine, die ins Medium von Suspensionskulturen sekretiert werden haben auf ihrem Weg dorthin die Zellwand zu passieren. Wir haben nun untersucht, ob CBP20 in der Zellwand lokalisiert war und ob es Unterschiede zwischen den beiden Kulturen gab. Überraschenderweise konnten wir CBP20 in Zellwänden der beiden Kulturen nachweisen (siehe Abb. 3-26). Bei der CHN der Klasse I zeigte es sich, daß in der 2,4D-haltigen Kultur scheinbar das gesamte Protein in der Zellwand akkumuliert wurde. In Zellwänden von Blättern waren allerdings weder CBP20 noch die CHN detektierbar. Um eine Verunreinigung der Zellwandpräparation durch innerzelluläre Proteine auszuschließen wurde als Kontrolle das in den Plastiden lokalisierte Protein Transketolase verwendet. Da dieses Protein nur in der 0,4 M Saccharose-Waschlösung und im Gesamtextrakt nachweisbar war, kann man Präparationsfehler fast ausschließen. Allerdings könnte man für CBP20, welches auf Grund seiner Lektindomäne eine hohe Affinität zu Kohlenhydrat-haltigen Strukturen hat, eine Bindung an die Zellwand erwarten. Somit wäre auch möglich, daß CBP20 aus abgestorbenen und lysierten Zellen an die Zellwand bindet und somit das Ergebnis verfälschen könnte. Um diesen Aspekt auszuschließen, wurde ein weiterer Versuch durchgeführt, bei dem nach 12 h *in vivo* Markierung die suspensionskultivierten Zellen protoplastiert wurden. Damit wollten wir den Anteil des neugebildeten Proteins in der Zellwand untersuchen. Allerdings ist das Protoplastieren von suspensionskultivierten Zellen nicht ganz einfach, da die Zellwand sehr stabil ist. Deshalb ist nicht ganz auszuschließen, daß sich in der Protoplastenfraktion auch noch wenige ganze Zellen befanden, die das Ergebnis jedoch nicht beeinflussen. Im Ergebnis konnten wir feststellen, daß ungefähr die Hälfte des neugebildeten CBP20-Proteins sich in der Zellwandfraktion befand. Bei der CHN der Klasse I und der GLN ist der Anteil in der Zellwandfraktion sogar höher als in der Protoplastenfraktion. Für dieses Experiment stand uns leider kein Antikörper als Kontrolle für innerzelluläre Proteine zu Verfügung. Der im We-

sternblot verwendete Antikörper wurde gegen das denaturierte TK-Protein nach Überexpression in *E. coli* hergestellt und war somit ungeeignet für die Immunoabsorption des nativen Proteins.

Da wir in 2,4D-frei kultivierten Zellen CBP20 in der Zellwand aber nicht im Medium nachweisen konnten, stellte sich die Frage ob 2,4D womöglich Auswirkungen auf die Permeabilität bzw. die Porosität der Zellwände haben könnte. Wir nutzten dazu eine Methode, bei der die Permeation von neutralen polydispersen Dextranen mit definierter Größe durch die Zellwand analysiert wurde. Die dazu durchgeführten Experimente zeigten, daß die Porengröße der Zellwand durch 2,4D beeinflußt wurde (siehe Abb. 3-28). Wir konnten auch nachweisen, daß die Erhöhung der Porengröße durch die Anwesenheit von 2,4D bewirkt wurde, indem wir zu einer 2,4D-freien Kultur zusätzlich 2,4D gegeben hatten. Da der kleinste von uns ermittelte Stoke's Radius in Zellwänden der 2,4D-freien Kultur 2,4 nm betrug und der Stoke's Radius eines 20 kDa-Proteins ca. 2 nm ist, kann die Porengröße nicht allein für die extrazelluläre Akkumulation von CBP20 verantwortlich sein. Allerdings wichen unsere gemessenen Porengrößen von denen von Suzuki *et al.* (1998) veröffentlichten Daten ab. Diese gaben für Zellwände von Tabaksuspensionskulturen eine mittlere Porengröße von 37 nm an. Diese Bestimmung beruhte aber auf einer anderen Methode. Hier wurden die für die Elektronenmikroskopie hergestellten Schnitte vermessen, wobei diese Messung aber nicht die Permeation durch die Zellwand berücksichtigte.

Pektine können als Hauptbestandteil der pflanzlichen Zellwand, einen Einfluß auf die Porengröße haben (Baron-Epel *et al.* 1988; Jarvis, 1984; Hahn *et al.*, 1989). Sie können mit Kalzium eine Brückenbindung eingehen, was zur Ausbildung einer gelartigen Struktur in der Zellwand führt (Jarvis, 1984). Es wäre daher denkbar, daß 2,4D eine Veränderung in der Pektinstruktur bewirkt, was zu einem veränderten Sekretionsverhalten führt. Untersuchungen von Fujino and Itoh (1998) haben jedoch gezeigt, daß die Aggregation von Pektin-Polysacchariden durch Kalzium-Brücken nicht die entscheidende Rolle für die Porengröße spielt. Sie vermuten vielmehr, daß die neutralen Zuckerseitenketten der Pektine durch Interaktionen mit anderen Zellwandkomponenten eine Veränderung der Porengröße bewirken.

Da wir zeigen konnten, daß die veränderte Porengröße nach 2,4D-Behandlung nicht die alleinige Ursache für die Anwesenheit von CBP20 im Medium sein kann, haben wir die Hauptbestandteile der Zellwand in Abhängigkeit vom Kultivierungsmedium untersucht. Dabei konnten wir in Zellwänden von 2,4D-haltigen Kulturen über den gesamten Kultivierungsraum einen höheren Proteingehalt nachweisen. Bei der Untersuchung des Gesamtkohlenhydratgehaltes, dem Zellulosegehalt und der Bestimmung der Galakturonsäure, als Hauptbestandteil des Pektins, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen beiden Kulturen festzustellen. Es kann zwar nicht ausgeschlossen werden, daß es in der Veresterung der Pektine oder in der Struktur der Zellwände Veränderungen durch 2,4D gibt, doch konnten wir diese durch unsere genutzten Bestimmungsmethoden nicht analysieren.

Bei der Bestimmung des pH-Wertes der Medien über den Kultivierungszeitraum wurde deutlich, daß der pH-Wert der 2,4D-haltigen Kultur vom 2. bis zum 10. d niedriger ist als in der 2,4D-freien Kultur. Der pH-Wert des Mediums steht durch das Donnan-Gleichgewicht mit dem pH-Wert der Zellwand in Beziehung. Die Zellwand bildet durch ihre Porengröße nicht nur eine sterische sondern auch eine elektrische Barriere. Durch eine pH-Wert-Änderung kommt es zur Entladung bzw. Umladung sehr vieler Proteine und somit unter Umständen zur Unlöslichkeit oder elektrostatischen Bindung an die Zellwand. Es wäre also vorstellbar, daß 2,4D durch die Vergrößerung der Porengröße und durch den niedrigeren pH-Wert des Mediums die extrazelluläre Akkumulation von CBP20 und auch anderer vakuolärer Proteine bewirkt.

Eine unterschiedliche Zusammensetzung der Zellwand, verbunden mit unterschiedlichen pH-Werten im Medium kann zur Bindung verschiedener Proteine an die Zellwand führen. Wir konnten nachweisen, daß CBP20 ionisch an die Zellwand gebunden wird. Die Stärke der Bindung nimmt im Laufe der Kultivierung zu, was entweder durch eine 2,4D-bedingte Veränderung der Ladung der Zellwand oder durch eine Veränderung in der Ladung des Proteins zustande kommen kann. Nun verändert sich die Zellwand einer Zelle ständig. Während des Wachstums einer Zelle ist die Dicke und die Zusammensetzung der Zellwand anders, als wenn sie altert und dann langsam abstirbt. Dadurch bedingt ändert sich auch die Porosität und das Bindungsverhalten an die Zellwand während eines Zellzyklus. Wir konnten allerdings nicht klären, was die genaue Ursache für das veränderte Bindungsverhalten ist.

4.5 Der innerzelluläre Transport von CBP20 in die Vakuole der Hefe erfolgt zeitlich verzögert.

Die Hefe *S. cerevisiae* diente als Modell für die innerzelluläre Lokalisation von CBP20. Es wurden dafür das Gen *GFP* und die Genfusionen *CBP20-GFP* und *NSP-GFP-VTP*, welches die Signalsequenzen der CHN der Klasse I enthielt, in den Stamm Cl3ABYS86 transformiert. Der Stamm Cl3ABYS86 ist nicht in der Lage, die Proteasen A, B und CPY in aktiver Form zu exprimieren, so daß er auf Grund seiner reduzierten proteolytischen Aktivität besonders für die Expression heterologer Gene geeignet scheint. (Bröker *et al.*, 1991).

Wie unsere Untersuchungen zur Lokalisation von CBP20 in der Hefe ergaben, wird das Genprodukt CBP20-GFP in der Vakuole aber auch in punktförmigen Spots außerhalb der Vakuole akkumuliert. Für analoge Untersuchungen anhand der CHN der Klasse I ist nachgewiesen worden, daß es sich bei den Spots um Subkompartimente des ER handelt, da Kunze *et al.* (1999) zeigen konnten, daß diese Regionen auch das ER-Chaperon Kar2/Bip akkumulieren.

Das Protein Kar2/Bip assoziiert mit neu synthetisierten Proteinen bis sie ihre korrekte Faltung erreicht haben. Unkorrekt gefaltete Proteine bleiben oft mit dem Chaperon assoziiert (Gething and Sambrook, 1992; Hammond and Helenius, 1995) und werden im ER zurückgehalten und abgebaut (Hammond and Helenius, 1995; Taylor 1997). Die Akkumulation fehlgefalteter Proteine im Lumen des ER induziert auch gleichzeitig eine erhöhte Expression von Kar2/Bip (Normington *et al.*, 1989; Rose *et al.*, 1989). In Hefezellen ist der „ER-Abbau“ von Finger *et al.* (1993) für zwei mutierte vakuoläre Proteine, Proteinase yscA (PrA) und Carboxypeptidase yscY (CPY) beschrieben worden, die unmittelbar nach ihrem Eintritt in den „sekretorischen Pathway“ abgebaut werden. Unkorrekt gefaltete, lösliche Proteine können aber auch zur Vakuole transportiert werden. Ein Hybridprotein bestehend aus dem α -Repressorprotein und der sekretorischen Invertase wird zur Oberfläche transportiert, wohingegen thermodynamisch instabile Hybridproteine zur Vakuole gelangen (Hong *et al.*, 1996).

Die von uns vermuteten ER-Subkompartimente sind denen sehr ähnlich, die von Umebayashi *et al.* (1997) für die Retention fehlgefalteter Proteine, wie die modifizierte Aspartatproteinase RNAP-1 des filamentösen Pilzes *Rhizopus neveus*, gezeigt worden sind. Während das intakte Protein in *S. cerevisiae* effi-

zient sekretiert wird, wird das fehlgefaltete Protein vom normalen ER in proliferierende ER-Aggregate sortiert, um die ER-Funktion weiterhin aufrechterhalten zu können. In den ER-Subkompartimenten werden die Proteine dann abgebaut. Umebayashi *et al.* (1997) fand allerdings im Gegensatz zu uns keinerlei Akkumulation der fehlgefalteten Genprodukte in der Vakuole.

Die Transformantenzellen mit der cytosolischen GFP-Variante zeigten ausschließlich Fluoreszenz im Cytosol, wohingegen die Transformanten mit dem Fusionsprotein NSP-GFP-VTP, mit den Signalsequenzen der CHN der Klasse I, eine alleinige Akkumulation in der Vakuole der Hefezellen zeigte. Man könnte daraus schließen, daß die pflanzlichen Signalsequenzen in der Hefe erkannt und somit auch richtig prozessiert werden. Dagegen spricht allerdings, daß wie bei Kunze *et al.* (1999) gezeigt, Fusionsproteine mit GFP und ohne das VTP des CHN-Gens auch zur Vakuole transportiert werden. Es wird vermutet, daß GFP im Zusammenspiel mit dem NSP des CHN-Gens ein noch unbekanntes Signal für den Transport zur Vakuole in Hefezellen beinhaltet, denn es konnte auch gezeigt werden, daß die sekretorische Invertase ebenfalls zur Vakuole transportiert wird.

Somit kann man zusammenfassend feststellen, daß unsere Untersuchungen in der Hefe keine schlüssige Aussage zur Lokalisation und dem innerzellulären Transport des pflanzlichen Proteins CBP20 zuläßt. Die Hefe ist also kein geeignetes Modell für Untersuchungen zum Transport des Proteins CBP20.

5 Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht ein Streß-induzierbares Tabakprotein, daß als Chitin-bindendes-Protein mit einer Molekularmasse von ca. 20 kDa (CBP20) identifiziert werden konnte. CBP20 wird von einer kleinen Genfamilie, bestehend aus wenigstens 2 Vertretern codiert und gehört zu den PR-4 Proteinen. CBP20 wurde erstmals von Ponstein *et al.* (1994) isoliert und charakterisiert.

Untersuchungen zum Expressionsmuster von CBP20 haben gezeigt, daß das Protein konstitutiv in Tabaksuspensionskulturen sowie in „source“-Blättern und der Wurzel von Tabakpflanzen akkumuliert wird. Der Anstieg der CBP20-Proteinkonzentration mit zunehmenden Blattalter, bei gleichzeitiger Abnahme der Chlorophyllkonzentration, führten zu der Schlußfolgerung, daß das Protein CBP20 durch Seneszenz induziert wird. Damit ähnelt das CBP20-Expressionsmuster bezüglich der Seneszenz-bedingten Induktion und der konstitutiven Synthese in Wurzeln dem der basischen PR-Proteine GLN der Klasse I und des OLP.

Unterschiede im Expressionsverhalten zu anderen basischen PR-Proteinen sind nach Salicylsäurebehandlung festgestellt worden. 48 h nach Behandlung konnte CBP20, im Vergleich zur nicht behandelten Kontrolle, auch in jungen und mittelalten Blättern von *in vitro* Pflanzen nachgewiesen werden. Ein Kontrollexperiment mit der basischen CHN der Klasse I zeigte dagegen keinen Einfluß von SA auf deren Akkumulation. Daher wäre es möglich, daß CBP20 durch einen Signaltransduktionsweg induziert wird, der von dem für die Induktion der CHN abweicht.

Die Expression von CBP20 schien komplex – sowohl auf Transkriptionsebene als auch auf Translationsebene – reguliert zu sein, denn unter bestimmten induzierenden Bedingungen wie z.B. der Verwundung und bei Schwermetallstreß konnte keine Korrelation zwischen Protein- und Transkriptkonzentration festgestellt werden. Außerdem konnte in jungen Blättern sowie im Sproß CBP20-m-RNA aber kein Protein nachgewiesen werden, wohingegen die Situation für mittelalte Blätter genau entgegengesetzt war.

Die Akkumulation von CBP20 wird durch Schwermetalle beeinflusst. 100 µM ZnCl₂ bewirken in Tabaksuspensionskulturen bis zum 4. d nach der Subkultivierung eine Erhöhung der CBP20-Proteinkonzentration. Die Behandlung mit AgNO₃, CdSO₄, CoCl₂ und CuSO₄ führte zu keiner erhöhten CBP20-Proteinkonzentration.

In Blättern kommt es dagegen zu einer verstärkten Akkumulation von CBP20 nach Inkubation in 10 mM CdSO₄, CuSO₄ oder ZnCl₂.

Zinkchlorid erhöht nicht die Stabilität der CBP20-m-RNA, denn nach 2- bzw. 4stündiger Inkubation mit dem Transkriptionshemmer Actinomycin D ist die Abnahme der Transkriptkonzentration in den Schwermetall-behandelten Blättern intensiver als in „source“-Blättern einer Gewächshauspflanze, in denen CBP20 konstitutiv akkumuliert wird. Das heißt Zinkchlorid induziert eine Erhöhung des CBP20-Transkriptkonzentration.

Es sind 3 potentielle Promotorsequenzen isoliert worden (*CBP20/1*, *CBP20/2* und *CBP20/3*). Promotor *CBP20/1* besaß im 3'-Bereich Homologie zum cDNA-Klon *cbp20-52* (Ponstein *et al.*, 1994), während die beiden Promotoren *CBP20/2* und *CBP20/3* eine größere Homologie zum Klon *cbp20-44* aufwiesen. Alle 3 potentiellen Promotoren enthalten konservierte Sequenzbereiche wie GC-Box, W-Box, G-Box, GT-1 Bindungsstelle und das *as-1* Element.

Alle drei potentiellen Promotorsequenzen wurden für die Überprüfung ihrer Promotoraktivität mit einem modifiziertem *uidA*-Reportergen, das das Enzym β -Glukuronidase codiert, fusioniert und durch Agrobakterien-vermittelte Transformation in Tabakpflanzen exprimiert. Das modifizierte Gen enthielt ein Intron, so daß seine Expression erst nach einem Eukaryonten-typischen „Splicing“ erfolgen kann. Die Promotor-GUS-Fusionen zeigten in den Wurzeln eine CBP20-typische Expression. In Blättern konnte jedoch nach Schwermetallbehandlung keine GUS-Aktivität nachgewiesen werden. Dafür kann es mehrere Gründe geben. Entweder werden die Promotor-GUS-Fusionen unterhalb der Nachweisgrenze exprimiert oder das Schwermetall induziert eine Promotor-unabhängige Expressionserhöhung. Es kann aber auch nicht ausgeschlossen werden, daß die von uns isolierten Sequenzen unvollständig sind. Es wäre denkbar, daß der Teil, der für die Aktivierung durch das Schwermetall verantwortlich ist, weiter im 5'-Bereich zu suchen ist.

Um die Funktion von CBP20 näher charakterisieren zu können, wurden Tabakpflanzen mit „sense“- und „antisense“-Konstrukten von CBP20 transformiert, um eine erhöhte bzw. reduzierte Expression von CBP20 zu erreichen. Die erhaltenen „sense“-Pflanzen akkumulierten CBP20 in allen Pflanzenorganen, wohingegen in den „antisense“-Pflanzen kein CBP20-Protein in den Blättern und der Wurzel nachgewiesen werden konnte. Experimente zur Analyse der Auswirkungen der verän-

dernten CBP20-Konzentration auf die Resistenz gegenüber Streßsituationen, steht jedoch noch aus.

CBP20 wird ebenso wie andere PR-Proteine der Klasse I wie z.B. die CHN und die GLN, als Präproprotein mit einem N-terminalen Signalpeptid, für die Aufnahme ins ER und einem C-terminalen Propeptid gebildet. Die C-terminalen Propeptide sind vermutlich für den Transport der Proteine zur Vakuole verantwortlich. Es konnte nachgewiesen werden, daß der zeitliche Ablauf der C-terminalen Prozessierung von CBP20 ähnlich der der GLN abläuft. Nach 3 h liegt CBP20 ebenso wie die GLN als reife Form vor.

CBP20 wurde in Tabaksuspensionkulturen in Abhängigkeit von der Anwesenheit des Auxins 2,4D auch ins Kulturmedium sekretiert. Anhand von verschiedenen Kontrollexperimenten konnte ausgeschlossen werden, daß die extrazelluläre Akkumulation von CBP20 durch Zellbruch zustande kam. Da 2,4D die CBP20-Transkriptkonzentration und damit vermutlich die Proteinkonzentration erhöht, könnte der Export zumindest teilweise durch eine Überlastung des vakuolären „Sortings zustande gekommen sein.

Während der Export von CBP20 ins Kulturmedium von Tabaksuspensionskulturen nur bei Kultivierung in Gegenwart des Auxins 2,4D nachgewiesen werden konnte, wird das Protein unabhängig von dem Auxin in der Zellwand akkumuliert.

Um die Ursachen für die 2,4D-bedingte Akkumulation des Proteins im Kulturmedium zu klären, wurden die Porengrößen und die Zusammensetzung der Zellwände, nach Kultivierung ohne und mit 2,4D, untersucht. 2,4D bewirkt eine Erhöhung der Porengröße, genauer gesagt der Stoke's Radien von Zellwänden. Die Erhöhung des Stoke's Radius durch 2,4D kann jedoch nicht der alleinige Grund für die Akkumulation von CBP20 im Medium sein, denn CBP20 besitzt auf Grund seiner Molekularmasse von 20 kDa einen theoretischen Stoke's Radius von 2 nm, der unter dem kleinsten der gemessenen Stoke's Radien lag. Bei der Untersuchung der Zellwandbestandteile der beiden Suspensionskulturen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede, die die beobachteten Exportunterschiede erklären könnten.

CBP20 konnte mit einem salzhaltigen Puffer nicht aber unter Verwendung von Puffern mit Zuckern oder Detergentien aus Zellwandpräparationen isoliert werden. Daraus wurde geschlußfolgert, daß das Protein durch eine ionische Bindung in

der Zellwand verbleibt. Die Bindung von CBP20 an die Zellwand ist in 2,4D-Kulturen offenbar schwächer als in 2,4D-frei kultivierten Zellen. So genügten in den 2,4D-Kulturen 0,05 M NaCl um CBP20 von der Zellwand zu lösen, wogegen in den 2,4D-freien Kulturen 0,15 M NaCl nötig waren. Erstaunlicherweise nahm die Bindungsstärke des Proteins an die Zellwand im Laufe der Kultivierung zu. Nach 10 Tagen benötigt man in 2,4D-Kulturen 0,15 M NaCl und in 2,4D-freien Kulturen mehr als 0,25 M NaCl um CBP20 zu extrahieren.

Bei unseren Untersuchungen in der Hefe konnte durch Westernblotexperimente gezeigt werden, daß CBP20 ausschließlich in den Zellen lokalisiert ist. Durch die Fusion mit GFP konnte CBP20 in der Vakuole der Hefezelle und in punktförmigen Kompartimenten außerhalb der Vakuole nachgewiesen werden. Offensichtlich ist die Hefe kein geeignetes Modellsystem für den CBP20-Transport.

6 Literatur

- L.R. Abad, M. Paino D'Urzo, D. Liu, M.L. Narasimhan, M. Reuveni, J.K. Zhu, S. Niu, N.K. Singh, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan**, Antifungal activity of tobacco osmotin has specificity and involves plasma membrane permeabilization, *Plant Sci.* **118** (1996) 11-23
- O. Baron-Epel, P.K. Gharyal, M. Schindler**, Pectins as mediator of wall porosity in soybean cells, *Planta* **175** (1988) 389-395
- C. Barry, G. Fangeron, J.-L. Rossignol**, Methylation induced premeiotically in *Ascosporus*: coextension with DNA repeat lengths and effect on transcription elongation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90** (1993) 4557-4561
- D.C. Bassham, N.V. Raikhel**, Transport proteins in the plasma membrane and the secretory system, *Trends in Plant Sci.* **1** (1996) 15-20
- D. Becker, E. Kemper, J. Schell and R. Masterson**, New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border, *Plant Mol. Biol.* **20** (1992) 1195-1197
- R. Beffa and F. Meins Jr.**, Pathogenesis-related functions of plant β -1,3-glucanases investigated by antisense transformation – a review, *Gene* **179** (1996) 97-103
- M. Bevan**, Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation, *Nucl. Acids Res.* **12** (1984) 8711-8721
- G.F. Birkenmeier, C.A. Ryan**, Wound signaling in tomato plants, *Plant Physiol.* **117** (1998) 687-693
- H.C. Birnboim, J. Doly**, A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.* **7** (1979) 1513-1523
- U.C. Biswal, B. Biswal**, Ultrastructural modification and biochemical changes during senescence of chloroplasts, *Int. Rev. Cytol.* **113** (1988) 271-321
- J.F. Bol, A.S. Buchel, M. Knoester, T. Baladin, L.C. Van Loon, H.J.M. Linthorst**, Regulation of the expression of plant defence genes, *Plant Growth Regul.* **18** (1996) 87-91
- T. Boller**, Antimicrobial functions of the plant hydrolases, chitinase and β -1,3-glucanase, In: B. Fritig, M. Legrand, *Mechanisms of Plant Defense Responses*, (Eds.), Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1993, pp. 391-400
- K. Borck, J.D. Geggs, W.J. Brammar, A.S. Hopkins, N.E. Murray**, The construction in vitro of transducing derivatives of phage Lambda, *Mol. Gen. Genet.* **146b** (1976) 199-205
- M.M. Bradford**, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254

- F.Th. Brederode, H.J.M. Linthorst, J.F. Bol**, Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding, *Plant Mol. Biol.* **17** (1991) 1117-1125
- T.Y. Chai, L. Didierjean, G. Burkard, G. Genot**, Expression of a green tissue-specific 11 kDa proline-rich protein gene in bean in response to heavy metals, *Plant Science* **133** (1998) 47-56
- W.L. Chiu, Y. Niwa, W. Zeng, T. Hirano, H. Kobayashi, J. Sheen**, Engineered GFP as vital reporter in plants, *Curr. Biol.* **6** (1996) 325-330
- M.J. Chrispeels**, Sorting of proteins in the secretory system, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **42** (1991) 21-53
- M.J. Chrispeels, N.V. Raikhel**, Short peptide domains target proteins to plant vacuoles, *Cell* **68** (1992) 613-616
- D.B. Collinge, K.M. Kragh, J.D. Mikkelsen, K.K. Nielsen, U. Rasmussen, K. Vad**, Plant chitinases, *Plant J.* **3** (1993) 31-40
- J.P. Coles, A.L. Phillips, S.J. Croker, R. Garcia-Lepe, M.J. Lewis, P. Hedden**, Modification of gibberellin production and plant development in *Arabidopsis* by sense and antisense expression of gibberellin 20-oxidase genes, *Plant J.* **17** (5) (1999) 547-556
- C.M. Condit, B. Keller**, The glycine-rich cell wall proteins of higher plants. In: W.S. Adair, R.P. Mecham, Organization and assembly of plant and animal extracellular matrix, (eds.), Academic Press, New York, 1990, pp. 119-135
- C. Cordier, M.J. Pozo, J.M. Barea, S. Gianinazzi and V. Gianinazzi-Pearson**, Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular mycorrhizal fungus, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **10** (1998) 1017-1028
- D.J. Cosgrove**, Assembly and enlargement of the primary cell wall in plants, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **13** (1997) 171-201
- K.M. Davies, D. Grierson**, Identification of cDNA clones for tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) mRNAs that accumulate during fruit ripening and leaf senescence in response to ethylene, *Planta* **179** (1989) 73-80
- F. De Carvahlo, G. Gheysen, S. Kushnir, M. Van Montagu, D. Inze, C. Castrejana**, Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants, *EMBO J.* **11** (1992) 2595-2602
- S. Delagrava, R.E. Hawtin, C.M. Silva, M.M. Yang, D.C. Youvan**, Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein, *Bio-Technology* **13** (1995) 151-154
- S. de Pater, V. Greco, K. Pham, J. Memelink, J. Kijne**, Characterization of a zinc-dependent transcriptional activator from *Arabidopsis*, *Nucl. Acid Res.* **24** (1996) 4624-4631
- M. De Tapia, P. Bergman, A. Awade, G. Burkard**, Analysis of acid extractable bean leaf proteins induced by mercuric chloride treatment and alfalfa mosaic virus infection. Partial purification and characterisation, *Plant Sci.* **45** (1986) 167-177

- L.F. Dickey, M. Gallo-Maegher, W.F. Thompson**, Light regulatory sequences are located within the 5' portion of the *Fed-1* message sequence, *EMBO J.* **11** (1992) 2311-2317
- L. Didierjan, P. Frendo, W. Nasser, G. Genot, J. Marivet, G. Burkard**, Heavy-metal-responsive genes in maize: identification and comparison of their expression upon various forms of abiotic stress, *Planta* **199** (1996) 1-8
- L. Didierjan, P. Frendo, G. Burkard**, Stress response in maize: sequence analysis of cDNAs encoding glycine-rich proteins, *Plant Mol. Biol.* **18** (1992) 847-849
- R.A. Dietrich, S.E. Radke, J.J. Harada**, Downstream DNA sequences are required to activate a gene expressed in the root cortex of embryos and seedlings, *Plant Cell* **4** (11) (1992) 1371-1382
- S.H. Doares, J. Narvaes-Vasquez, A. Conconi, C.A. Ryan**, Salicylic acid inhibits synthesis of proteinase inhibitors in tomato leaves induced by systemin and jasmonic acid, *Plant Physiol.* **108** (1995) 1741-1746
- R.J. Dohmen, A.W.M. Strasser, C.B. Höner, C.P. Hollenberg**, An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera, *Yeast* **7** (1991) 691-692
- A. Driouich, G.F. Zhang, L.A. Staehelin**, Effect of brefeldin A on the structure of the Golgi apparatus and secretion of proteins and polysaccharides in sycamore maple (*Acer pseudoplatanus*) suspension-cultured cells, *Plant Physiol.* **101** (1993) 1363-1373
- W. Dröge-Laser, A. Kaiser, W.P. Lindsay, B.A. Halkier, G.J. Loake, P. Doerner, R.A. Dixon, C. Lamb**, Rapid stimulation of a soybean protein-serine kinase that phosphorylates a novel bZIP DNA-binding protein, G/HBF-1, during the induction of early transcription-dependent defenses, *EMBO J.* **16** (1997) 726-738
- T. Ehrig, D.J. O'Kane, F.G. Prendergast**, Green-fluorescent protein mutants with altered fluorescence excitation spectra, *FEBS Lett.* **367** (1995) 163-166
- R.C. Elliott, T.J. Pedersen, B. Fristensky, M.J. White, L.F. Dickey, W.F. Thompson**, Characterisation of a single copy gene encoding ferredoxin I from pea, *Plant Cell* **1** (1989) 681-690
- J.G. Ellis, J.G. Tokuhisa, D.J. Llewellyn, D. Bouchez, K. Singh, E.S. Dennis, W.S. Peacock**, Does the *ocs*-element occur as a functional component of the promoters of plant genes?, *Plant J.* **4** (1993) 433-443
- N. Faber, R.H. Glew**, α -D-Mannosidase, in H.U. Bergmeyer (Ed): *Methods of enzymatic analysis*, Vol. 4, Chemie Weinheim, 1984, Deerfield Beach Florida Base, 230-240

L. Faye, A.C. Fitchette-Lainé, V. Gomord, A. Chekkafi, A.M. Delaunay, A. Driouch, Detection, biosynthesis and some functions of glycans N-linked to plant secreted proteins, In: SEB Seminar, series 53 – Post-translational modifications in plants. (eds) N.H. Battay, H.G. Dickinson, A.M. Hetherington, Cambridge University Press (1993) 213-242

B. Feinberg, C.S. McLaughlin, Isolation of yeast mRNA and *in vitro* translation in a yeast cell-free system, In: I. Campbell, J.H. Duffus (Eds.): Yeast a practical approach, IRL Press, 1988, Oxford-Washington DC, 147-161

A.P. Feinberg, B. Vogelstein, A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity, *Anal. Biochem.* **132** (1983) 6-13

A. Finger, M. Knop, D.H. Wolf, Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast, *Eur. J. Biochem.* **218** (1993) 565-574

R.M. Fourney, J. Miyakoshi, R.F. Day, M.E. Paterson, Northern blotting: efficient RNA staining and transfer, *Focus* **10** (1988) 5-7

R.S.S. Fraser, Evidence for the occurrence of the 'pathogenesis-related' proteins in leaves of healthy tobacco plants during flowering, *Physiol. Plant Oath.* **19** (1981) 69-76

L. Friedrich, M. Moyer, E. Ward, J. Ryals, Pathogenesis-related protein 4 is structurally homologous to the carboxy-terminal domains of hevein, Win-1 and Win-2, *Mol. Gen. Genet.* **230** (1991) 113-119

T. Fujino and T. Itoh, Changes in pectin structure during epidermal cell elongation in pea (*Pisum sativum*) and its implications for cell wall architecture, *Plant Cell Physiol.* **39** (12) (1998) 1315-1323

Y. Fukuda, H. Shinshi, Characterization of a novel *cis*-acting element that is responsive to a fungal elicitor in the promoter of a tobacco class I chitinase gene, *Plant Mol. Biol.* **24** (1994) 485-493

Y. Fukuda, Interaction of tobacco nuclear proteins with an elicitor-responsive element in the promoter of a basic class I chitinase gene, *Plant Mol. Biol.* **34** (1997) 81-87

T. Gaffney, L. Friedrich, B. Vernooij, D. Negretto, G. Nye, S. Uknes, E. Ward, H. Kessmann, J. Ryals, Requirement of salicylic acid for the induction of systemic acquired resistance, *Science* **261** (1993) 754-756

S. Gal, N.V. Raikhel, A carboxy-terminal plant vacuolar targeting signal is not recognized by yeast, *Plant J.* **6** (1994) 235-240

P. Geoffroy, M. Legrand, B. Fritig, Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3** (1990) 327-333

H.-H. Gerdes and C. Kaether, Green fluorescent protein: applications in cell biology, *FEBS Lett.* **389** (1996) 44-47

- M.-J. Gething, J.F. Sambrook**, Protein folding in the cell, *Nature* **355** (1992) 33-45
- V. Gomord, L. Faye**, Signals and mechanisms involved in intracellular transport of secreted proteins in plants, *Plant Physiol. Biochem.* **34** (1996) 165-181
- W.J. Gordon-Kamm, M.T. Spencer, L.M. Mangano, T.R. Adams, R.J. Daines, W.G. Start, J.V. O'Brien, S.A. Chambers, W.R. Adams, N.G. Willets, T.B. Rice, C.J. Mackey, R.W. Krueger, A.P. Krausch, P.G. Lemaux**, Transformation of maize cells and regeneration of transgenic plants, *Plant Cell* **2** (7) (1990) 603-618
- P.J. Green, M.H. Yong, M. Cuozzo, Y. Kano-Murakami, P. Silverstein, N.-H. Chua**, Binding site requirement for pea nuclear protein factor GT-1 correlate with sequences required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS-3a* gene, *EMBO J.* **13** (1988) 4035-4044
- P.J. Green, S.A. Kay, N.-H. Chua**, Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbc-3a* gene, *EMBO J.* **6** (1989) 2543-2549
- M.G. Hahn, P. Bucheli, F. Cervone, S.H. Doares, R.A. O'Neil, A. Darvill, P. Albersheim**, Roles of cell wall constituents in plant-pathogen interactions, In: *Plant-Microbe Interactions. Molecular and Genetic Perspectives*, Vol. 3, Edited by T. Koseuge and E.W. Nesdter, McGraw Hill, New York, 1989, pp. 131-181
- C. Hammond, A. Helenius**, Quality control in the secretory pathway, *Curr. Biol.* **7** (1995) 523-529
- D. Hanahan**, Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids, *J. Mol. Biol.* **166** (1983) 557-580
- C. Hanfrey, M. Fife, V. Buchanan-Wollaston**, Leaf senescence in *Brassica napus*: expression of genes encoding pathogenesis-related proteins, *Plant Mol. Biol.* **30** (1996) 597-609
- C. Hawes, L. Faye, B. Satiat-Jeunemaitre**, The Golgi apparatus and pathways of vesicle trafficking. In: *Membranes: specialized functions in plants*. Ed. M. Smallwood, J.P. Knox, D.J. Bowles (1995) Oxford: BIOS Scientific XXVIII, 337-365
- R. Heim, D.C. Prasher, R.Y. Tsien**, Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 12501-12504
- R. Heim, A.B. Cubitt, R.Y. Tsien**, Improved green fluorescence, *Nature* **373** (1995) 663-664
- R. Heim and R.Y. Tsien**, Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelength and fluorescence resonance energy transfer, *Curr. Biol.* **6** (1996) 178-182
- W. Heinemeyer, J.A. Kleinschmidt**, Proteinase yscE, the yeast proteasome/multicatalytic - multifunctional proteinase, *EMBO J.* **10** (1991) 555-562
- J. Hejgaard, S. Jacobsen, I. Svendsen**, Two antifungal thaumatin-like proteins from barley grain *FEBS Lett.* **291** (1991) 127-131

- A. Helenius, T. Marquardt, I. Braakman**, The endoplasmic reticulum as a protein folding compartment, *Trends Cell Biol.* **2** (1992) 227-231
- J. Hennig, R.E. Dewey, J.R. Cutt, D.F. Klessig**, Pathogen, salicylic acid and developmental dependent expression of a β -1,3-glucanase/GUS gene fusion in transgenic tobacco plants, *Plant J.* **4** (1993) 481-493
- G. Hensel, M. Brosius, I. Maeting, T. Wartmann, C. Horstmann, G. Kunze, I. Kunze**, Cloning of the wound-inducible protein CBP20 and expression in suspension cultures of tobacco, *Plant Science* **128** (1997) 199-206
- K. Herbers, P. Meuwly, J.P. Metraux, U. Sonnewald**, Salicylic acid-independent induction of pathogenesis-related protein transcripts by sugars is dependent on leaf developmental stage, *FEBS Letters* **397** (1996) 239-244
- E.M. Herman and B.A. Larkins**, Protein storage bodies and vacuoles, *Plant Cell* **11** (1999) 601-613
- N. Hiraiwa, M. Nishimura, I. Hara-Nishimura**, Expression and activation of the vacuolar processing enzyme in *Saccharomyces cerevisiae*, *Plant J.* **12** (4) (1997) 819-829
- H. Hirano, S. Komatsu, A. Nakamura, F. Kikuchi, H. Kajiwara, S. Tsunasawa, F. Sakiyama**, Structural homology between semidwarfism-related proteins and glutenin seed protein rice (*Oryza sativa* L.), *J. Biochem.* **111** (1991) 754-757
- S.L.A. Hobbs, P. Kpodar and C.M.O. Delong**, The effect of T-DNA copy number, position and methylation on reporter gene expression in tobacco transformants, *Plant Mol. Biol.* **15** (1990) 851-864
- E. Hong, A.R. Davidson, C.A. Kaiser**, A pathway for targeting soluble misfolded proteins to the yeast vacuole, *J. Cell Biol.* **135** (1996) 623-633
- E.E. Hood, S.B. Gelvin, L.S. Melchers, A. Hoekema**, New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants, *Transgenic Res.* **2** (1993) 208-218
- M.C. Jarvis**, Structure and properties of pectic gels in plant cell walls, *Plant Cell Environ.* **7** (1984) 153-164
- R.A. Jefferson, T.A. Kavanagh, M.W. Bevan**, GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* **6** (13) (1987) 3901-3907
- G. Kaiser, E. Martinoia, A. Wimken**, Rapid appearance of photosynthetic products in the vacuoles isolated from barley mesophyll protoplasts by a new fast method, *Z Pflanzenphysiol.* **107** (1982) 103-113
- S. Kauffmann, M. Legrand, P. Geoffroy, B. Fritig**, Biological function of pathogenesis-related proteins: Four PR-proteins have β -1,3-glucanase activity, *EMBO J.* **6** (1987) 3209-3212
- S. Kauffmann, M. Legrand, B. Fritig**, Isolation and characterisation of six pathogenesis-related (PR) proteins of Samsun NN of tobacco, *Plant Mol. Biol.* **14** (1990) 381-390

- S.A. Kay, B. Keith, K. Shinozaki, M.-L. Chye, N.-H. Chua**, The rice phytochrome gene: structure, autoregulated expression, and binding of GT-1 to a conserved site in the 5' upstream region, *Plant Cell* **1** (1989) 351-360
- S.-R. Kim, J.-L. Choi, M.A. Costa, G. An**, Identification of G-box sequence as an essential element for methyl jasmonate response of potato proteinase inhibitor II promoter, *Plant Physiol.* **99** (1992) 627-631
- G.J. King, C.E. Hussey Jr., V.A. Turner**, A Protein induced by NaCl in suspension cultures of *Nicotiana tabacum* accumulates in whole plant roots, *Plant Mol. Biol.* **7** (1986) 441-449
- B.E. Kirsop**, Culture and preservation, in B.E. Kirsop, C.P. Kurtzman, Living resources for biotechnology: yeast's, Cambridge University Press, 1988, Cambridge-New York-New Rochelle-Melbourne-Sydney
- S. Kitajima and F. Sato**, Plant pathogenesis-related proteins: Molecular mechanisms of gene expression and protein function, *J. Biochem.* **125** (1999) 1-8
- D.J. Klionsky, L.M. Banta, S.D. Emr**, Intracellular sorting and processing of a yeast vacuolar hydrolase: proteinase A propeptide contains vacuolar targeting information, *Mol. Cell Biol.* **8** (1988) 2105-2116
- I. Kunze, S. Hillmer, G. Kunze, K. Müntz**, Brefeldin A differentially affects protein secretion from suspension-cultured tobacco cells (*Nicotiana tabacum* L.), *J. Plant Physiol.* **146** (1995a) 71-80
- I. Kunze, G. Kunze, S. Ramm, C. Horstmann, R. Manteuffel, K. Müntz**, Two polypeptides that are secreted from suspensions-cultured tobacco cells in the presence of brefeldin A have chitin-binding domains, *J. Plant Physiol.* **147** (1995b) 63-70
- I. Kunze, G. Kunze, M. Bröker, R. Manteuffel, F. Meins Jr., K. Müntz**, Evidence for secretion of vacuolar α -mannosidase, class I chitinase, and class I β -1,3-glucanase in suspension cultures of tobacco cells, *Planta* **205** (1998a) 92-99
- I. Kunze, C. Nilsson, K. Adler, R. Manteuffel, C. Horstmann, M. Bröker, G. Kunze**, Correct targeting of a vacuolar tobacco chitinase in *Saccharomyces cerevisiae* - post-translational modifications are dependent on the host strain, *Biochim. Biophys. Acta* **1395** (1998b) 329-344
- I. Kunze, G. Hensel, K. Adler, J. Bernard, B. Neubohn, C. Nilsson, R. Stoltenburg, S.D. Kohlwein, G. Kunze**, The green fluorescent protein targets secretory proteins to the yeast vacuole, *Biochim. Biophys. Acta* **1410** (1999) 287-298
- U.K. Laemmli**, Cleavage of structural protein during assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature (London)* **227** (1970) 680-685
- E. Lam, P.N. Benfey, P.M. Gilmartin, R.-X. Fang, N.-H. Chua**, Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86** (1989) 7890-7894
- M.-L. Laukkanen, C. Oker-Blom, K. Keinänen**, Secretion of green fluorescent protein from recombinant baculovirus-infected insect cells, *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **226** (1996) 755-761

- K.A. Lawton, S.L. Potter, S. Uknes, J. Ryals**, Acquired resistance signal transduction in *Arabidopsis* is ethylene independent, *Plant Cell* **6** (1994) 581-588
- M. Legrand, S. Kauffmann, P. Geoffroy, B. Fritig**, Biological function of 'pathogenesis-related' proteins: four tobacco PR-proteins are chitinases, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** (1987) 6750-6754
- Y. Li, G. Hagen, T.J. Guilfoyle**, An auxin-responsive promoter is differentially induced by auxin gradient during tropisms, *Plant Cell* **3** (11) (1991) 1167-1175
- Y. Li, T.J. Strabala, G. Hagen, T.J. Guilfoyle**, The soybean SAUR open reading frame contains a *cis* element responsible for cycloheximide-induced mRNA accumulation, *Plant Mol. Biol.* **24** (1994) 715-723
- F. Linn, I. Heidmann, H. Saedler, P. Meyer**, Epigenetic changes in the expression of the maize A1 gene in *Petunia hybrida*: role of numbers of integrated gene copies and state of methylation, *Mol. Gen. Genet.* **222** (1990) 329-336
- J.E. Lincoln, R.L. Fisher**, Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression, *Mol. Gen. Genet.* **212** (1988) 71-75
- E.M. Linsmaier, F. Skoog**, Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures, *Physiol. Plant.* **18** (1965) 100-127
- H.J.M. Linthorst, L.S. Melchers, A. Mayer, J.S.C. Van Roekel, B.J.C. Cornelissen, J.F. Bol**, Analysis of gene families encoding acidic and basic β -1,3-glucanases of tobacco, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87** (1990a) 8756-8760
- H.J.M. Linthorst, L.C. van Loon, C.M.A. van Rossum, A. Mayer, J.F. Bol, J.S.C. van Roekel, E.J.S. Meulenhoff, B.J.C. Cornelissen**, Analysis of acidic and basic chitinases from tobacco and petunia and their constitutive expression in transgenic tobacco, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **3** (1990b) 252-258
- H.J.M. Linthorst, N. Danash, F.T. Brederode, J.A.L. Van Kan, P.J.G.M. De Wit**, Tobacco and tomato PR proteins homologous to wip1 and Pro-hevein lack the 'hevein' domain, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4** (1991) 586-592
- J. Logemann, J. Schell, L. Willmitzer**, Improved method for the isolation of RNA from plant tissues, *Anal. Biochem.* **163** (1987) 16-20
- R. Lorberth, C. Damman, M. Ebner, S. Amati, J.J. Sanchez-Serrano**, Promoter elements involved in environmental and developmental control of potato proteinase inhibitor II expression, *Plant J.* **2** (4) (1992) 477-486
- T. Lotan, N. Ori, R. Fluhr**, Pathogenesis-related proteins are developmentally regulated in tobacco flowers, *Plant Cell* **1** (1989) 881-887
- S. Luan, L. Bogorad**, A rice *cab* gene promoter contains separate *cis*-acting elements that regulate expression in dicot and monocot plants, *Plant Cell* **4** (8) (1992) 971-981
- J. Malamy, J.P. Carr, D.F. Klessig, I. Raskin**, Salicylic acid: A likely endogenous signal in the resistance response of tobacco to viral infection, *Science* **250** (1990) 1002-1004
- P. Maliga, A.S. Breznovits, L. Marton**, Streptomycin-resistant plants from callus culture of haploid tobacco, *Nature New Biol.* **244** (1973) 29-30

W.R. Marcotte, S.M. Russel, R.S. Quatrano, Absciscic acid responsive sequences from the Em gene of wheat, *Plant Cell* **1** (1989) 969-976

M. Margis-Pinheiro, C. Martin, L. Didierjan, G. Burkard, Differential expression of bean chitinase genes by virus infection, chemical treatment and UV-irradiation, *Plant Mol. Biol.* **22** (1993) 659-668

F. Marty, Plant vacuoles, *Plant Cell* **11** (1999) 587-599

K. Matsuoka and K. Nakamura, Transport of sweet potato storage protein, sporamin, to the vacuole in yeast cells, *Plant Cell Physiol.* **33** (1992) 453-462

F. Mauch, B. Mauch-Mani, T. Boller, Antifungal hydrolases in pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3-glucanase, *Plant Physiol.* **88** (1988) 936-942

I. Meier, K. Hahlbrock, I.E. Somssich, Elicitor-inducible and constitutive in vivo DNA footprints indicate novel *cis*-acting elements in the promoter of a parsley gene encoding pathogenesis-related protein 1, *Plant Cell* **3** (1991) 309-315

F. Meins, J.M. Neuhaus, C. Sperisen, J. Ryals, The primary structure of plant pathogenesis-related glucanohydrolases and their genes, In: T. Boller, F. Meins (Eds.), *Genes Involved in Plant Defence*, Springer Verlag, 1992, pp. 245-282

J. Memelink, H.J. Linthorst, R.A. Schilperoort, J.H. Hoge, Tobacco genes encoding acidic and basic isoforms of pathogenesis-related proteins display different expression patterns, *Plant. Mol. Biol.* **14** (1990) 119-126

A.E. Menkens, U. Schindler, A.R. Cashmore, The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins, *Trends Biochem. Sci.* **20** (1995) 506-510

J.-P. Mettraux, H. Singer, J. Ryals, E. Ward, M. Wyss-Benz, J. Gaudin, K. Raschdorf, E. Schmid, W. Blum, B. Inverardi, Increase in salicylic acid at the onset of systemic acquired resistance in cucumber, *Science* **250** (1990) 1004-1006

P. Meyer, F. Linn, I. Heidmann, H. Meyer, I. Niedenhof, H. Saedler, Endogenous and environmental factors influence 35S promoter methylation of a maize A1 gene construct in transgenic petunia and its colour phenotype, *Mol. Gen. Genet.* **231** (1992) 345-352

J. Mol, R. Van Blokland, J. Kooter, More about co-suppression, *Trends Biotech.* **9** (1991) 182-183

J.N.M. Mol, R. Van Blokland, P. De Lange, M. Stam, and J.M. Kooter, Post-transcriptional inhibition of gene expression: sense and antisense genes, In: J. Paszkowski (ed.), *Homologous recombination and gene silencing in plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 1994, pp. 309-334

T. Mozo and P.J.J. Hooykaas, Factors affecting the rate of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Nicotiana glauca* plant cells, *Plant Mol. Biol.* **19** (6) (1992) 1019-1030

A.D. Neale, J.A. Wahleithner, M. Lund, et al., Chitinase, β -1,3-glucanase, osmotin and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation, *Plant Cell* **2** (1990) 673-684

- J.M. Neuhaus**, Protein targeting to the plant vacuole, *Plant Physiol. Biochem.* **34** (2) (1996) 217-221
- J.M. Neuhaus and J.C. Rogers**, Sorting of proteins to vacuoles in plant cells, *Plant Mol. Biol.* **38** (1998) 127-144
- T. Niderman, I. Genetet, T. Bruyere, R. Gees, A. Stintzi, M. Legrand, B. Fritig and E. Mosinger**, Pathogenesis-related PR-1 proteins are antifungal – isolation and characterisation of three 14-kilodalton proteins of tomato and of basic PR-1 of tobacco with inhibitory activity against *Phytophthora infestans*, *Plant Physiol.* **108** (1995) 17-27
- T. Niki, I. Mitsuhashi, S. Seo, N. Ohtsubo, Y. Ohashi**, Antagonistic effect of salicylic acid and jasmonic acid on the expression of pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves, *Plant Cell Physiol.* **39** (1998) 500-507
- Y. Nishimura, H. Takeshima, M. Sakaguchi, K. Mihara, T. Omura, K. Kato, M. Himeno**, Expression of rat cathepsin D cDNA in *Saccharomyces cerevisiae*: implications for intracellular targeting of cathepsin D to vacuoles, *J. Biochem.* **118** (1995) 168-177
- L.D. Nooden**, Absciscic acid, auxin and other regulators of senescence, In: L.D. Nooden, A.C. Leopold, (Eds.), *Senescence and ageing in plants*, Academic Press, San Diego, 1988, pp. 330-386
- K. Normington, K. Kohno, Y. Kozutsumi, M.-J. Gething, J.F. Sambrook, S. cerevisiae** encodes an essential protein homologous in sequence and function to mammalian Bip, *Cell* **57** (1989) 1223-1236
- Y. Ohashi, M. Matsuoka**, Induction and secretion of pathogenesis-related proteins by salicylate or plant hormones in tobacco suspension cultures, *Plant Cell Physiol.* **28** (1987) 573-580
- M. Ohme-Takagi, H. Shinshi**, Structure and expression of a tobacco β -1,3-glucanase gene, *Plant Mol. Biol.* **15** (1990) 941-946
- M. Ohme-Takagi and H. Shinshi**, Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element, *The Plant Cell* **7** (1995) 173-182
- S. Omirulleh, M. Abraham, M. Golovkin, I. Stefanov, M.K. Karabaev, L. Mustardy, S. Morocz, D. Dudits**, Activity of a chimeric promoter with the doubled CaMV 35S enhancer element in protoplast-derived cells and transgenic plants in maize, *Plant Mol. Biol.* **21** (1993) 415-428
- R.A. Padgett, P.J. Grabowski, M.M. Konarska, S. Seiler, P.A. Sharp**, Splicing of messenger RNA precursors, *Annu. Rev. Biochem.* **55** (1986) 1119-1150
- S.Z. Pang, D.L. Deboer, Y. Wan, G.B. Ye, J.G. Layton, M.K. Neher, C.L. Armstrong, J.E. Fry, M.A.W. Hinchey, M.E. Fromm**, An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants, *Plant. Physiol.* **112** (1996) 893-900
- G. Payne, E. Ward, T. Gaffney, P. Ahl, M. Moyer, A. Harper, F. Meins, J. Ryals**, Evidence for a third structural class of β -1,3-glucanase in tobacco, *Plant Mol. Biol.* **15** (1990) 797-808

C.M.J. Pieterse, L.C. Van Loon, Salicylic acid-independent plant defence pathways, *TIPS* **4** (1999) 52-58

A.S. Ponstein, S.A. Bres-Vloemans, M.B. Sela-Buurlage, P.J.M. van den Elzen, L.S. Melchers, B.J.C. Cornelissen, A novel pathogen- and wound-inducible tobacco (*Nicotiana tabacum*) protein with antifungal activity, *Plant Physiol.* **104** (1994) 109-118

S. Potter, S. Uknes, K. Lowton, A.M. Winter, D. Chandler, J. DiMaio, et al., Regulation of a hevein-like gene in *Arabidopsis*, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **6** (1993) 680-685

M. Rauscher, A.L. Adam, S. Wirtz, R. Guggenheim, K. Mendgen and H.B. Deising, PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean, *Plant J.* **19** (6) (1999) 625-633

P. Reymond, E.E. Farmer, Jasmonate and salicylate as global signals for defense gene expression, *Current Opinion Plant Biol.* **1** (1998) 404-411

E. Rezzonico, N. Flury, F. Meins Jr., R. Beffa, Transcriptional down-regulation by abscisic acid of pathogenesis-related β -1,3-glucanase genes in tobacco cell cultures, *Plant Physiol.* **117** (1998) 585-592

W.K. Roberts, C.P. Selitrennikoff, Zeamatin, an antifungal protein from maize with membrane-permeabilizing activity, *J. Gen. Microbiol.* **136** (1990) 1771-1778

J.C. Rogers and S.W. Rogers, Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid *cis*-acting hormone response complexes, *Plant Cell* **4** (11) (1992) 1443-1451

M. Romanos, C. Scorer, J. Clare, Foreign gene expression in yeast: a review, *Yeast* **8** (1992) 423-488

M.D. Rose, L.M. Misra, J.P. Vogel, *KAR2*, a karyogamy gene, is the yeast homologue of the mammalian Bip/GRP78 gene, *Cell* **57** (1989) 1211-1221

P.J. Rushton, H. Macdonald, A.K. Huttly, C.M. Lazarus, R. Hooley, Members of a new family of DNA-binding proteins bind to a conservative *cis*-element in the promoters of α -*Amy2* genes, *Plant Mol. Biol.* **29** (1995) 691-702

P.J. Rushton, J.T. Torres, M. Parniske, P. Wernert, K. Hahlbrock, I.E. Somssich, Interaction of elicitor-induced DNA binding proteins with elicitor response elements in the promoters of parsley PR 1 genes, *EMBO J.* **15** (1996) 5690-5700

P.J. Rushton and I.E. Somssich, Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens, *Curr. Opinion Plant Biol.* **1** (1998) 311-315

J.A. Ryals, U.H. Neuenschwander, M.G. Willits, A. Molina, H.-Y. Steiner, M.D. Hunt, Systemic acquired resistance, *Plant Cell* **8** (1996) 1809-1819

C.A. Ryan, Protease inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens, *Annu. Rev. Phytopathol.* **28** (1990) 425-449

M. Sakaguchi, Eukaryotic protein secretion, *Curr. Opin. Biotech.* **8** (1997) 595-601

- J. Sambrook, E.F. Fritsch, T. Maniatis**, Molecular cloning - a laboratory manual, Cold Spring Laboratory Press (1989) CSH, New York
- A.A. Sanderfoot and N.V. Raikhel**, The specificity of vesicle trafficking: coat proteins and SNAREs, *Plant Cell* **11** (1999) 629-641
- F. Sanger, S. Micken, A.R. Coulson**, DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977) 5463-5467
- B. Satiat-Jeunemaitre, C. Hawes**, Insights into the secretory pathway and vesicular transport in plant cells. *Biol. Cell* **79** (1993a) 7-15
- B. Satiat-Jeunemaitre, C. Hawes**, The distribution of secretory products in plant cells is affected by brefeldin A, *Cell Biol.* **17** (1993b) 183-193
- F. Sato, S. Kitajima, T. Koyama and Y. Yamada**, Ethylen-induced gene expression of Osmotin-like protein, a neutral isoform of tobacco PR-5, is mediated by the AGCCGCC *cis*-sequence, *Plant Cell Physiol.* **37** (3) (1996) 249-255
- U. Schindler, A.R. Cashmore**, Photoregulated gene expression may involve ubiquitous DNA binding proteins, *EMBO J.* **9** (1990) 3415-3427
- P. Schweizer, A. Buchala, P. Silverman, M. Seskar, I. Raskin, J.P. Metraux**, Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels, *Plant Physiol.* **114** (1997a) 79-88
- P. Schweizer, A. Buchala, J.-P. Metraux**, Gene-expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid, *Plant Physiol.* **115** (1997b) 61-70
- P. Schweizer, A. Buchala, R. Dudler, J.-P. Metraux**, Induced systemic resistance in wounded rice plants, *Plant J.* **14** (4) (1998) 475-481
- G. Sembder, B. Parthier**, The biochemistry and the physiological and molecular actions of jasmonates, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **44** (1993) 569-589
- J. Sheen, S. Hwang, Y. Niwa, H. Kobayashi, D.W. Galbraith**, Green-fluorescent protein as a new vital marker in plant cells, *Plant J.* **8** (1995) 777-784
- H. Shinshi, H. Wenzler, J.M. Neuhaus, G. Felix, J. Hofsteenge, F. Meins Jr.**, Evidence for N- and C-terminal processing of a plant defence-related enzyme: primary structure of tobacco prepro- β -1,3-glucanase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (1988) 5541-5545
- H. Shinshi, S. Usami, M. Ohme-Takagi**, Identification of an ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene, *Plant Mol. Biol.* **27** (1995) 923-932
- B.W. Shirley, R.B. Meagher**, A potential role for RNA turnover in the light regulation of plant gene expression: ribulose-1,5-biphosphate carboxylase small subunit in soybean, *Nucl. Acids Res.* **18** (1990) 3377-3385
- A.M. Showalter, J. Zhou, D. Rumeau, S.G. Worst, J.E. Varner**, Tomato extensin and extensin-like cDNAs: structure and expression in response to wounding, *Plant Mol. Biol.* **16** (1991) 547-565

- C.M. Smart**, Gene expression during leaf senescence, *New Phytol.* **126** (1994) 419-448
- L.A. Staehelin**, The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains, *Plant J.* **11** (1997) 1151-1165
- A. Stanford, M. Bevan, D. Northcote**, Differential expression within a family of novel wound-induced genes in potato, *Mol. Gen. Genet.* **215** (1989) 200-208
- J.C. Steffens**, The heavy metal-binding peptides of plants, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **41** (1990) 553-575
- L. Sticher, U. Hinz, A. Meyer, F. Meins**, Intracellular transport and processing of a tobacco vacuolar β -1,3-glucanase, *Planta* **188** (1992) 559-565
- A. Stintzi, T. Heitz, V. Prasad, S. Wiedemann-Merdinoglu, S. Kauffmann, P. Geoffroy, M. Legrand, B. Fritig**, Plant 'pathogenesis-related' proteins and their role in defense against pathogens, *Biochim.* **75** (1993) 687-706
- K. Suzuki, K. Baba, T. Itoh, Y. Sone**, Localization of the xyloglucan in cell walls in a suspension culture of tobacco by rapid-freezing and deep-etching techniques coupled with immunogold labelling, *Plant Cell Physiol.* **39** (10) (1998) 1003-1009
- B.W. Tague and M.J. Chrispeels**, The plant vacuolar protein phytohemagglutinin is transported to the vacuole of transgenic yeast, *J. Cell. Biol.* **105** (1987) 1971-1979
- C.B. Taylor**, Controlling the quality of secretory proteins in plants, *Plant Cell* **9** (1997) 1697-1699
- M. Thom, A. Maretzki, E. Komor**, Vacuoles from sugarcane suspension cultures, *Plant Physiol.* **69** (1982) 1315-1319
- H. Thomas, J.L. Stoddart**, Leaf senescence, *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31** (1980) 83-111
- H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon**, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gel electrophoresis, *Anal. Biochem.* **178** (1989) 4350-4354
- D. Twell, J. Yamaguchi, S. McCormick**, Pollen-specific gene expression in transgenic plants: coordinate regulation of two different tomato gene promoters during microsporogenesis, *Development* **109** (1990) 705-713
- R. Van Blokland, P. De Lange, J.N.M. Mol, J.M. Kooter**, Modulation of gene expression in plants by antisense genes, In: B. Lebleu (ed.) *Antisense research and applications*, CRC Press, Boca Raton, 1993, pp. 125-148
- M.D. van de Rhee, R. Lemmers and J.F. Bol**, Analysis of regulatory elements involved in stress-induced and organ-specific expression of tobacco acidic and basic β -1,3-glucanase genes, *Plant Mol. Biol.* **21** (1993) 451-461
- H. van der Wel, K. Loeve**, Isolation and characterisation of thaumatin I and II, the sweet-tasting proteins from *Thaumatococcus daniellii* Benth., *J. Biochem.* **31** 221-225

- J.E. Varner and L.-S. Lin**, Plant cell wall architecture, *Cell* **56** (1989) 231-239
- B. Vernooij, L. Friedrich, A. Morse, R. Reist, R. Kolditz-Jawhar, E. Ward, et al.**, Salicylic acid is not the translocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction, *Plant Cell* **6** (1994) 959-965
- A.J. Vigers, W.K. Roberts, C.P. Selitrennikoff**, A new family of plant antifungal proteins, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **4** (1991) 315-321
- A.J. Vigers, S. Wiedemann, W.K. Roberts, M. Legrand, C.P. Selitrennikoff, B. Fritig**, Thaumatin-like pathogenesis-related proteins are antifungal, *Plant Sci.* **83** (1992) 155-161
- A. Vitale, A. Ceriotti, J. Denecke**, The role of the endoplasmic reticulum in protein synthesis, modification and intracellular transport, *J. Exp. Bot.* **44** (1993) 1417-1444
- A. Vitale and J. Denecke**, The endoplasmic reticulum – gateway of the secretory pathway, *Plant Cell* **11** (1999) 615-628
- E.R. Ward, G.B. Payne, M.B. Moyer, S.C. Williams, S.S. Dincher, K.C. Sharkey, J.J. Beck, H.P. Taylor, P. Ahl-Goy, F. Meins, J.A. Ryals**, Differential regulation of β -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection, *Plant Physiol.* **96** (1991a) 390-397
- E.R. Ward, S.J. Uknes, S.C. Willias, S.S. Dincher, D.L. Wiederhold, D.C. Alexander, et al.**, Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance, *Plant Cell* **3** (1991b) 1085-1094
- H. Woehlecke, R. Ehwald**, Characterization of size-permeation limits of cell walls and porous separation materials by high-performance size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr.* **708** (1995) 263-271
- C.P. Woloshuk, J.S. Meulenhoff, M. Sela-Buurlage, P.J.M. Van den Elzen, B.J.C. Cornelissen**, Pathogen-induced proteins with inhibitory activity toward *Phytophthora infestans*, *Plant Cell* **3** (1991) 619-628
- Y. Xu, P.-FL. Chang, D. Liu, M.L. Narasimhan, K.G. Raghothama, P.M. Hasegawa, R.A. Bressan**, Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate, *Plant Cell* **6** (1994) 1077-1085
- N. Yalpani, P. Silverman, T.M.A. Wilson, D.A. Kleier, I. Raskin**, Salicylic acid is a systemic signal and an inducer of pathogenesis-related proteins in virus-infected tobacco, *Plant Cell* **3** (1991) 809-818
- P. Yang, C. Chen, Z. Wang, B. Fan and Z. Chen**, A pathogen- and salicylic acid-induced WRKY DNA-binding activity recognizes the elicitor response element of the tobacco class I chitinase gene promoter, *The Plant J.* **18(2)** (1999) 141-149
- T.T. Yang, L.Z. Cheng, S.R. Kain**, Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein, *Nucl. Acid Res.* **24** (1996) 4592-4593
- Y. Yang, J. Shah, D.F. Klessig**, Signal perception and transduction in plant defense responses, *Genes Dev.* **11** (1997) 1621-1639

Z.H. Ye, J.E. Varner, Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues, *Plant Cell* **3** (1991) 23-37

D.J. Yun, R.A. Bressan, P.M. Hasegawa, Plant antifungal proteins, In: J. Janick (Eds.) *Plant Breeding Reviews*, John Wiley & Sons, New York, 1997, Vol. 14, pp. 39-88

S. Zhang, J. Sheng, Y. Liu, M.C. Mehdy, Fungal elicitor-induced bean proline-rich protein mRNA down-regulation is due to destabilization that is transcription and translation dependent, *Plant Cell* **5** (1993) 1089-1099